

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

# DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

# LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

# EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN FUERTE EN INTESTINO DE RATONES BALB/c SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de maestra en ciencias farmacéuticas

# **PRESENTA**

Machorro Rojas Nancy

Matrícula: 2141800617

# Comité Tutoral:

Tutora: Dra. Teresita del Rosario Sainz-Espuñes

Co-Tutora: Dra. María Elisa Drago-Serrano

Asesora: Dra.Marycarmen Godínez-Victoria

Septiembre, 2016



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

# DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

# MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

# LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

# EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN FUERTE EN INTESTINO DE RATONES BALB/c SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO

VISTO BUENO (Vo.Bo.) DEL COMITÉ TUTORAL

Tutora: Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes	
Co- Tutora: Dra. María Elisa Drago Serrano	
Asesora: Dra. Marycarmen Godínez Victoria	
Alumna: Nancy Machorro Rojas	
Matricula: 2141800617	



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

# DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

# LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

# EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN FUERTE EN INTESTINO DE RATONES BALB/c SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO

# JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Presidente: Dra. Rosa Adriana Jarillo	
Vocal: Dra. Jazmín García Machorro	
Secretario: Dra. María Elisa Drago Serrano	

### RESUMEN

El estrés es una señal de alarma que evoca la respuesta de factores neuroendocrinos inducidos tras la activación del eje Hipotalamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y del eje cerebro-intestino (BG. El estrés puede afectar la expresión de proteínas transmembranales de unión fuerte como la ocludina у claudinas, distribuidas diferencialmente en el tracto intestinal e involucradas en la regulación de la permeabilidad. La alteración de la expresión de proteínas de unión fuerte ocurre en enfermedades crónicas, como el síndrome de intestino irritado (IBS) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). El propósito de este estudió fue evaluarel efecto del estrés sobre la expresión de ocludina y claudinas (2, -4, -7, -12 y -15) en el duodeno, íleon y colon de ratones BALB/c. Se consideraron 2 grupos: 1) ratones estresados por inmovilización durante 2 h por 4 días consecutivos (n=6) y 2) grupo control sin estrés (n=6), los cuales fueron sacrificados con isoflurano y sangrados por punción cardiaca. Se diseccionó el intestino y se aisló el duodeno, íleon, y colon; Se obtuvo la mucosa para la determinación de la expresión génica por la técnica de RT-qPCR y la expresión proteica por la técnica de Western blot. Los resultados fueron analizados con la prueba t de Student y para comparar más de dos grupos, se realizó un análisis ANOVA de una vía. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de P<0.05.En las diferentes regiones del intestino se encontró lo siguiente: En el duodeno, en comparación con el grupo control, en el grupo estresado la expresión del mRNA aumentó en todas las claudinas analizadas. En cuanto a la expresión proteica, aumentó en las claudina-2 y -12 y, disminuyó en las claudina-7 y -15, en tanto que la expresión proteica de la claudina-4 fue indetectable. Además, no se observan diferencias significativas en la expresión transcripcional ni proteica de la ocludina. En el íleon, en comparación con el grupo control, en el grupo estresado la expresión del mRNA disminuyó significativamente en la ocludina y claudina-2, -4, -12 y -15 y, aumentó significativamente en la claudina-7; A nivel proteico solo claudina-2 disminuyó significativamente. En la región del colon, en comparación con el grupo control, en el grupo estresado la expresión génica y proteica de ocludina y claudina-2, -4, -12 y -15 disminuyó significativamente. En relación a claudina-7, la expresión de mRNA aumentó y de proteína disminuyó. El efecto del estrés sobre la expresión de las proteínas de unión fuerte podría resultar de la interacción de hormonas corticosteroides liberadas tras la activación del eje HPA con neurotransmisores y neuropéptidos liberados por fibras nerviosas del eje cerebro-intestino y diferencialmente distribuidas en el tracto intestinal. Por lo tanto, el modelo de estrés por inmovilización induce cambios en los niveles de expresión de ocludina, claudina-2, -4, -7 -12 y -15 según el segmento intestinal de estudio.

Palabras clave: estrés, proteínas de unión fuerte, ocludina, claudinas, duodeno, íleon, colon.

# **ABSTRACT**

INTRODUCTION. Stress is an alarm signal that evokes the response of neuroendocrine factors upon activation of the HPA axis and BG axis. Stress can affect the expression of the tight junction transmembrane proteins occludin and claudins that are differentially distributed in the intestinal tract and they are involved in the regulation of permeability. Altered expression of tight junction transmembrane proteins has been found in chronic diseases like the irritable bowel syndrome (IBS) and intestinal bowel disease (IBD). The purpose of this study was to evaluate the effect of stress on the expression of occludin and claudins (-2, -4, -7, -12 and -15) in the duodenum, ileum and colon of BALB/c mice. We worked with two groups: 1) mice stressed by immobilization for 2 h for 4 consecutive days (n = 6) and 2) control without stress (n = 6) group, which were euthanized with isoflurane and bled by cardiac puncture. The intestine was dissected and duodenum, ileum, and colon was isolated. Each region mucosa was obtained for determination of gene expression by the RT-gPCR and protein expression by Western blot. Results were analyzed with the Student t test and to compare more than two groups, an ANOVAone way analysis was performed. The differences were considered significant at P values <0.05. In the intestine different regions results were as follows: in the duodenum; compared with the control group, in the stressed group mRNA expression increased in all claudins analyzed. The protein expression, increased in claudin-2 and -12 and decreased in the claudin-7 and -15, while the protein expression claudin-4 was undetectable. In addition, no significant differences were observed in transcriptional or protein expression of occludin. In the ileum; compared with the control group, in the stressed group mRNA expression was significantly decreased in the occludin and claudin-2, -4, -12 and -15 and significantly increased claudin-7; Claudin-2 protein level decreased significantly. In the colon, compared with the control group, in the stressed group protein and gene expression of occludin and claudin-2, -4, -12 and -15 significantly decreased. Regarding claudin-7 mRNA expression it increased and protein level decreased significantly. The effect of stress on the expression of tight junction proteins could result from the interaction of stress hormones released after the activation of the HPA with neurotransmitters and neuropeptides released by nerve fibers of the brain-gut axis and differentially distributed in the intestinal tract. Therefore, the model immobilization stress induces changes in the expression levels of occludin, claudin-2, -4, -7 -12 -15 in the different intestinal segments studied.

**Keywords:** stress, tight junction proteins, occludin, claudins, duodenum, ileum, colon.

**AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES** 

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (beca No. 326989) para la realización de este proyecto.

Agradezco el apoyo del Bioterío de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), así como al Dr. Daniel Martínez y Lizbeth del Laboratorio de Microbiología agrónoma de esta Universidad.

A todos los compañeros (Dra. Judith Pacheco, Andrea, José Carlos y Mary) del laboratorio de Bioquímica II y a la Dra. Jazmín García Machorro del Laboratorio de Medicina de Conservación pertenecientes a la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

# **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A los pilares de mi educación, mis padres, quienes me enseñaron a volar para alcanzar y realizar todos mis sueños. Mami gracias por ser mi mejor amiga, escucharme, tenerme paciencia y estar a mi lado en todo momento de mi vida. Papi por ser esa persona que siempre me motiva a seguir adelante y por tu apoyo en cada proyecto que emprendo. También, a mi tía Gloria (Yoyis) por formar parte de mi vida, apoyándome en más de una forma y a mi tía Isabel por creer en mí.

Jocelyn por ser la mejor hermana y una persona maravillosa, siempre escuchando mis ideas y riendo de las mismas en tantas noches de insomnio. A mis hermanos, Rodrigo, Luis y Juan Carlos que siempre han estado a mi lado durante este camino y todos aquellos que hemos recorrido juntos.

A mis amigas, Angélica, Lucero, Diana por creer en mí, apoyarme y darme ánimos en todo. Betzy por brindarme su amistad, su tiempo y apoyo en todos los trabajos que realizamos juntas, sin olvidar los viajes realizados. Nimsi por compartir todos los momentos de alegría y preocupación en esta aventura. Gisela por escucharme y alentarme en momentos de angustia. Jimena, por apoyarme y compartir tus conocimientos.

A los nuevos y viejos amigos que este viaje me permitió reencontrar y conocer. Sin olvidar a Violeta, Karina y Araceli por ese intercambio de ideas, largas conversaciones, momentos de risa y entretenimiento dentro y fuera del laboratorio.

Quiero agradecer profundamente a la Dra. Teresita por su apoyo incondicional, su confianza, paciencia y motivación. A la Dra. Elisa por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por sus consejos, apoyó y ánimo que me

ha brindado durante este proyecto. Dra. Marycarmen por su tiempo, orientación, enseñanzas, y sobre todo por su afecto y amistad. También, al Dr. Jorge Castañeda por compartir sus conocimientos y su inestimable ayuda y a la Dra. Tere Izquierdo por motivarme durante toda mi formación profesional.

A todos ustedes les agradezco, el haberme aportado un granito de arena a mi crecimiento como persona e investigador.

"El hombre nunca sabe de lo que es capaz, hasta que lo intenta"

Charles Dickens

# ÍNDICE

2.	A	NTEC	EDENTES	. 19
3.	М	IARCO	) TEÓRICO	. 21
	3.1.	Est	rés	21
	3.2.	Cla	sificación del estrés	22
	3.	.2.1.	Efecto en el organismo	22
	3.	.2.2.	Naturaleza	23
	3.	.2.3.	Tiempo de exposición	23
	3.3.	Мо	delos animales	24
	3.	.3.1.	Estrés por inmovilización	24
	3.4.	Res	spuesta fisiológica al estrés	25
	3.5.	Fisi	ología y función del Intestino	26
	3.	.5.1.	Eje Cerebro – Intestino	30
		3.5.1.	Sistema nervioso entérico	30
		3.5.1.	2. Microbiota del intestino	30
	3.	.5.2.	Función del epitelio intestinal	31
	3.	.5.3.	Uniones fuertes o estrechas	32
		3.5.3.	1. Ocludina	34
		3.5.5.	2 Claudinas	36
	3.	.5.4.	Regulación de las uniones fuertes	38
	_	.5.5.	Relación de las proteínas de unión fuerte y enfermedades	
	•		ntestinales	
			tamiento farmacológico para el estrés	
			EAMIENTO DEL PROBLEMA	
			ESIS	
			VOS	
	_		neral	
			ticulares	
			IALES Y MÉTODOS	
			males	
			delo de estrés	
			colección de las muestras de mucosa del intestino	
			racción de RNA	
	75	Sín	tasis de cDNA	17

7.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	48
7.7. Western blot	49
7.7.1. Extracción de proteínas totales	50
7.7.2. Electroforesis SDS-PAGE	50
7.7.3. Transferencia Semi-húmeda	51
7.7.4. Inmunodetección	51
7.7.5. Desnudamiento ("Stripping")	52
7.8. Análisis estadístico	53
8. RESULTADOS	54
8.1. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y extracción de proteínas	54
8.2. Niveles de expresión de proteínas de unión fuerte en el intestino	54
8.2.1. Expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en el duodeno	
8.2.2. Expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en el íleon	57
8.2.3. Expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en el colon	59
9. DISCUSIÓN	61
10. CONCLUSIONES	66
11. PERSPECTIVAS	68
12. REFERENCIAS	69
ANEXOS	80
Anexo 1. Carta de aceptación del Bioterio	80
Anexo2. Resumenés y cartas de participación de eventos científicos	81

# **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro 1. Expresión de claudinas en el intestino humano y de ratón
Cuadro 2. Expresión de proteínas de unión fuerte y su relación con enfermedades gastrointestinales40
Cuadro 3. Secuencia de DNA para síntesis de los iniciadores48
ÍNDICE DE FIGURAS
Figura 1. Respuesta fisiológica al estrés por el SNC y su relación con el sistema endocrino, inmune y entérico
Figura 2. Fisiología del intestino29
Figura 3. Dibujo de las uniones estrechas
Figura 4. Localización celular de las uniones fuertes33
Figura 6. Representación esquemática de la estructura de ocludina35
Figura 7. Estructura general de la familia de claudinas
Figura 5. Regulación de la expresión de proteínas de unión fuerte
Figura 8. Expresión relativa de mRNA del grupo control para los genes de proteínas de unión fuerte en cada una de las regiones del intestino
Figura 9. Efecto del estrés sobre la expresión de proteínas de unión fuerte en e duodeno de dos experimentos independientes
Figura 10. Efecto del estrés sobre la expresión de proteínas de unión fuerte en e íleon de dos experimentos independientes
Figura 11. Efecto del estrés sobre la expresión de proteínas de unión fuerte en e colon de dos experimentos independientes

# **ABREVIATURAS**

**ACTH** Hormona adrenocortropica

**AJ** Uniones adherentes

**CC** Colitis colagenosa

**CD** Enfermedad de Crohn

**CRF** Factor liberador de corticotropina

**CRF1** Receptor 1 para factor liberador de corticotropina

**CRF2** Receptor 2 para factor liberador de corticotropina

**CU** Colitis Ulcerativa

**cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementario

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**EGF** Factor de crecimiento epidérmico

**ERK** Quinasa regulada por señales extracelulares

**GRE** Elemento glucocorticoide de respuesta

**HGF** Factor de crecimiento hepático

**HNF-**α Factor nuclear hepático- α

**HPA** Hipotálamo- Hipófisis-Adrenal

**HRP** Peroxidasa de rábano

IBD Enfermedad Inflamatoria Intestinal

**IBS** Síndrome de Intestino Irritable

**IFN-y** Interferón-y

**IL-1** Interleucina-1

**IL-2** Interleucina-2

**IL-6** Interleucina-6

**IL-12** Interleucina-12

**IL-17** Interleucina-17

**ISRS** Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina

JAM Moléculas de adhesión

**JNKs** familia de c-Jun N-terminal quinasas

**LEF** Factor potenciador linfoide

**mRNA** Ácido ribonucleico mensajero

MAP proteína quinasa activada por mitógeno

MCP Péptido quimiotáctico de macrófagos

MLCK Miosina de cadena ligera quinasa

M-MLV Virus de la Leucemia Murina de Moloney

MUPP1 Proteína-1 con dominios PDZ

**NK** Naturall Killer

NF-KB Factor nuclear potenciador de las cadenas Ligeras kappa de las células B

**PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PKC proteína quinasa C

**PM** Peso molecular

**PP1** Fosfatasa 1

**PP2** Fosfatasa 2

**PVDF** Fluoruro de polivinilideno

**PVN** Núcleo paraventricular

**ROCKs** Familia de quinasas

**SNA** Sistema Nervioso Autónomo

**SNC** Sistema Nervioso Central

**SNE** Sistema Nervioso Entérico

**TCF** Factor de células T

**TER** Resistencia transepitelial

**TGF-** $\beta$  Factor de crecimiento transformante-  $\beta$ 

**TGI** Tracto Gastrointestinal

Th1 Linfocitos T helper 1

Th2 Linfocitos T helper 2

**TNF-** $\alpha$  Factor de necrosis tumoral-  $\alpha$ 

**ZO-1** Zonula Ocludens 1

**ZO-2** Zonula Ocludens 2

**ZO-3** Zonula Ocludens 3

# 1. INTRODUCIÓN

Hoy en día, el estrés se ha convertido en una parte integral de la vida del ser humano ya que constantemente estamos expuestos a diferentes estresores como el ruido, tránsito, el trabajo, entre otros, que afectan la homeostasis del organismo. Sin embargo, han surgido diferentes definiciones que reconocen que el término estrés implica una amenaza ante la cual el organismo requiere de ajustes adaptativos que le permitan mantener la homeostasis y asegurar la supervivencia. La definición más integrada, establece que el estrés es un conjunto de eventos que requiere de un estímulo (factor de estrés), que precipita una reacción en el cerebro (la percepción del estrés) y que activa los sistemas de lucha o huida fisiológicos en el cuerpo (respuesta al estrés) (Dabhar y McEwen, 1997).

Existen diferentes tipos de estrés, de acuerdo a la naturaleza del estresor (físico, químico, psicológico o fisiológico), al tiempo de exposición (agudo o crónico) y al efecto en el organismo (eustress o distress). Por ello para evaluar el estrés, los modelos animales ofrecen la mejor aproximación para entender los mecanismos bio-psico-sociales implicados en su respuesta, siendo el más empleado el modelo de inmovilización como prototipo de estrés psicológico.

El estrés ésta implicado en la patogénesis de una variedad de enfermedades gastrointestinales, debido a que puede provocar que un organismo sea susceptible a una respuesta inflamatoria que puede llevar a alteraciones de la fisiología intestinal, tales como aumento de la permeabilidad del epitelio, el cual actúa como una barrera para impedir el paso de agentes nocivos, así como filtro selectivo de nutrientes, electrolitos y agua.

Cabe destacar que el contacto entre las células epiteliales incluye tres componentes estructurales: desmosomas, AJ y uniones fuertes o estrechas. Estás últimas compuestas por cuatro familias de proteínas transmembranales: ocludina, claudinas, JAM y tricelulina. En el caso de ocludina, es una proteína transmembrana que presenta dos dominios extracelulares, un dominio corto N-terminal citoplasmático y un dominio largo C-terminal citoplasmático y está involucrada en la regulación de la permeabilidad. Mientras que las claudinas, son

una familia compuesta por 24 proteínas con cuatro dominios transmembrana hidrofóbicos, dos dominios extracelulares y dominios citoplasmáticos N y Cterminal. Están involucradas en la formación de poros en la red de proteínas de unión fuerte, permitiendo el flujo de solutos pequeños y iones. Además, la expresión de estas proteínas es diferente en cada región intestinal.

Por ello, es importante conocer el efecto del estrés en la expresión de estas proteínas a través del intestino, ya que una desregulación en la expresión génica y proteica de las mismas influye en la permeabilidad intestinal, provocando el desarrollo de enfermedades en el tracto gastrointestinal como reflujo gastroesofágico, úlcera péptica, IBD (incluye colitis, enfermedad de Crohn) e IBS.

# 2. ANTECEDENTES

El epitelio intestinal forma el límite entre el cuerpo y las sustancias que provienen del ambiente externo y proporciona una barrera permeable selectiva que limita la penetración de moléculas nocivas, al tiempo que permite la absorción adecuada de nutrientes y agua (Kyoko et al. 2014). Esto debido a la presencia de proteínas de unión fuerte, como ocludina y claudinas. Sin embargo, la expresión y distribución tanto de los genes como las proteínas es diferente a través del tracto intestinal. Un ejemplo de ello es en el ratón, donde el gen de claudina-2 se observa fuertemente expresado en el área proximal del intestino, mientras que el gen de claudina-4 se expresa predominantemente en el colon (Lu et al., 2013). Respecto al gen de claudina-7, este es fuertemente expresado en el duodeno, íleon y colon. Sin embargo, el gen de claudina-12 se expresa fuertemente en el íleon y moderadamente en el colon. En el caso del gen de claudina-15, este se expresa fuertemente en duodeno y débilmente en íleon y colon. En cuanto a la expresión proteica, claudina-7 se observa en el duodeno, íleon y colon, mientras que claudina-12 se observa fuertemente en el íleon y débilmente en el colon y la expresión de la proteína de claudina-15 es fuerte en el duodeno y decrece en el colon (Fujita et al., 2006).

El estrés tiene una variedad de efectos sobre la función gastrointestinal como cambios en la motilidad, secreción y absorción intestinal, así como en la expresión de las proteínas de unión fuerte. En un estudio reciente, Mazzon y colaboradores (2008), demostraron que el estrés de inmovilización indujo un aumento en la permeabilidad del epitelio intestinal en el íleon terminal de rata (Mazzon et al, 2008). Además, Meddings y Swain (2000) han demostrado que el estrés psicológico en ratas inducidas por la restricción o una combinación de estrés psicológico-físico inducido por forzosa natación dió como resultado disfunción de la barrera gastrointestinal (Meddings et al, 2000). Por ello, si la barrera intestinal se ve afectada por el estrés repetido constante en forma crónica, esto puede conducir al aumento o la disminución de la permeabilidad intestinal, lo que puede dar lugar a una reacción inflamatoria local y sistémica perjudicial (Lambert, 2009), provocando

enfermedades como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn e IBS. De hecho, en un estudio realizado por Bertiaux-Vandaële y colaboradores (2011) en pacientes con IBS y predominante diarrea, observaron que la expresión de ocludina, estaba disminuida. Mientras, Liu y colaboradores (2013) observaron en pacientes con la enfermedad de Crohn, que la expresión de mRNA de claudina-4 y -12 en el colon disminuía.

Cabe destacar que el tratamiento con probióticos ayudó a reducir la disfunción de la barrera intestinal causada por el estrés psicológico en ratas, de acuerdo con el estudio realizado en 2006 por Zareie y colaboradores. También, existen compuestos naturales como el ácido ferúlico, encontrado en frutas y vegetales que protegen el epitelio intestinal contra el estrés por calor (He et al., 2016).

# 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1. Estrés

Actualmente, el estrés se ha convertido en una parte integral de la vida diaria ya que constantemente estamos expuestos a diferentes estresores definidos como condiciones ofactores de riesgo que exponen la sobrevivencia de un individuo (Van de Kar y Blair, 1999) como el ruido, el tránsito, el trabajo, un examen, ejercicio físico entre otros.

La palabra "estrés" se asocia con efectos negativos y se han propuesto diferentes significados para la misma desde el siglo XIV, sin embargo, el término de estrés fue tomado del latín *stringere:* tensar o estirar y utilizado por el idioma inglés *strain:* tensión, para describir la opresión, la adversidad y la dificultad (Moscoso, 1998). A finales del siglo XIX, el fisiólogo Claude Bernard observó que los organismos poseen un mecanismo de autorregulación que mantiene estable su medio interno ante presiones del medio externo. En 1914, Walter Cannon conceptualizó al estrés como un síndrome de lucha-huida y acuño el concepto homeostasis para referirse a la tendencia que poseen los seres vivos de mantener un equilibrio fisiológico (Johnson et al., 1992).

Más adelante, Hans Selye definió al estrés como una respuesta inespecífica a alguna amenaza, englobada en el concepto de Síndrome General de Adaptación, el cual presenta tres estados (Selye, 1951; McEwen, 2005; Von Borell, 2001):

- 1) Fase de alarma: reacción inicial del cuerpo ante un estímulo generador de estrés, se halla en estado de alerta y se coloca en situación de huida para reestablecer el equilibrio. (se activan las glándulas suprarrenales, liberando epinefrina y producción de glucocorticoides, los cuales ayudan a la restauración de homeostasis).
- 2) Fase de resistencia: si el estímulo persiste, la reacción surgida en la fase anterior se mantiene, pero disminuye su intensidad y el individuo intenta reestablecer el equilibrio. Es decir, la adaptación es sostenida, óptima y permite desarrollo de una estrategia de supervivencia.

3) Fase de agotamiento: El organismo no es capaz de adaptarse y el estresor es prolongado y severo, habrá un cese de la respuesta de adaptación, la cual conduce a la enfermedad y eventualmente a la muerte.

Desde el punto de vista médico, el estrés es una respuesta adaptativa de los sistemas endocrino, nervioso y respiratorio a estímulos externos e internos (Ramírez, 2007). Sin embargo, una definición más integrada establece que el estrés es una constelación de eventos, que consta de un estímulo (factor de estrés), que precipita una reacción en el cerebro (la percepción del estrés), que activa los sistemas de lucha o huida fisiológicos en el cuerpo (respuesta al estrés) (Dhabhar y McEwen, 1997).

El estrés continúo desestabiliza la homeostasis y como consecuencia se genera alostasis y carga alostatica, términos introducidos por Sterling y Eyer, los cuales se refieren a los procesos adaptativos e integrativos necesarios para mantener la homeostasis del organismo. El término alostasis, se refiere a los niveles de actividad requeridos para mantener en el individuo la estabilidad a través del cambio, entre los mediadores involucrados se encuentran las hormonas del eje hipotálamo-pituitaria -adrenal, catecolaminas y citocinas (Sterling y Eyer, 1988). El término carga alostatica, se refiere a los efectos de activación prolongada, continua o intermitente de efectores involucrados en la alostasis (Goldstein y McEwen, 2002). En general, la alostasis, es un proceso que lleva a la adaptación, en la cual los glucocorticoides y la epinefrina, así como otros mediadores, promueven la adaptación a los estresores (McEwen, 2005).

### 3.2. Clasificación del estrés

El estrés se puede clasificar de acuerdo al efecto en el organismo, a su naturaleza y al tiempo de exposición.

### 3.2.1. Efecto en el organismo

En esta clasificación encontramos los términos eustrés y distrés, los cuales son efectos adaptativos y no adaptativos, respectivamente, en respuesta al estrés.

El eustres (*Eu*: viene del griego bueno), es conocido como estrés bueno ya que está asociado con eventos positivos, por ejemplo, el nacimiento de un hijo, ganar una competencia, matrimonio, hacer nuevos amigos, entre otros (Colligan y Higgins, 2006). Es una respuesta de afrontamiento que permite al organismo adaptarse y sobrevivir, por la tanto resulta benéfico (Jiménez, et al., 2008). Es decir, ésta asociado a sentimientos positivos y a un estado físico saludable (Kupriyanov y Zhdanov, 2014), produciendo una respuesta que permite al organismo adaptarse y sobrevivir.

Mientras, el distrés, es un estrés severo asociado con sentimientos negativos e impedimento físico, llevando al deterioro de la capacidad de adaptación del organismo (Kupriyanov y Zhdanov, 2014). Se caracteriza por un contenido emocional de experiencias nocivas resultando en un efecto deletéreo en el bienestar del individuo (Jiménez, et al., 2008).

#### 3.2.2. Naturaleza

Estrés físico, cuando se exige demasiado al cuerpo, por ejemplo, ejercicio extremo donde se incrementa la liberación de catecolaminas, cortisol, hormona del crecimiento, entre otros (Ramírez, 2007).

Estrés psicológico, incluye una respuesta emocional o perceptual a un estímulo que puede desencadenar diversas patologías en el individuo (Jiménez, et al., 2008).

Estrés fisiológico, se refiere al estrés biológico que puede ser definido como condiciones internas o externas (ambientales, desarrollo y vejez) que modifican la homeostasis de la célula u organismo (Kagias et al., 2012).

# 3.2.3. Tiempo de exposición

En esta clasificación el estrés depende de la intensidad (tipo de inmovilización al cual el roedor es sometido), frecuencia (número de sesiones por día o semana) y duración del estresor (tiempo de exposición durante la sesión) (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

Estrés agudo, puede ser definido como un proceso que lleva a interpretar y evaluar la amenaza, el daño o la demanda en general, permite al organismo adaptarse y

sobrevivir (Jiménez, et al., 2008), es un evento que tiene una duración de un período de minutos a horas (Dhabar, 2009).

Estrés crónico, la exposición al agente estresante es excesiva, repetitiva y prolongada, la permanencia de los mecanismos adaptativos (alostasis), transforma un mecanismo protector y de ajuste transitorio en otro con alto poder patogénico (McEwen, 2005), es un tipo de estrés persistente por muchas horas días, semanas o meses (Dhabar, 2009). La exposición de los ratones a estrés crónico es ampliamente usada por los psiquiatras como modelo de depresión y recientemente ha sido introducido en estudios de la función de la barrera intestinal (Söderhom y Perdue, 2001).

#### 3.3. Modelos animales

Los modelos animales ofrecen la mejor aproximación para entender los mecanismos bio-psico-sociales del estrés en los organismos. Por ello, existen diferentes modelos para el estudio de estrés físico (fluctuación en temperatura, inmovilización, electroshock, nado forzado) y psicológico (aislamiento neonatal, convivencia con depredadores, cambios en ciclo día-noche) (Sutanto y De Kloet, 1994; Bathia et al., 2011; Jaggi et al., 2011).

## 3.3.1. Estrés por inmovilización

Este modelo es el más empleado para el estudio de la función intestinal y su relación con estrés (Söderhom y Perdue, 2001), en gran parte porque es sencillo, sin dolor y sin debilitamiento duradero en los animales. En el modelo de inmovilización se restringe la locomoción del animal. Este modelo consiste en que los miembros del animal son atados con cinta adhesiva sobre una tabla; Cabe destacar la importancia de dejar descansar a los animales en un periodo de 1 a 2 semanas antes del estudio para facilitar su manejo y minimizar el estrés por el contacto con humanos. También, es un modelo que permite observar efectos en el sistema inmune (Buynitsky y Mostofsky, 2009; Jaggi et al., 2011).

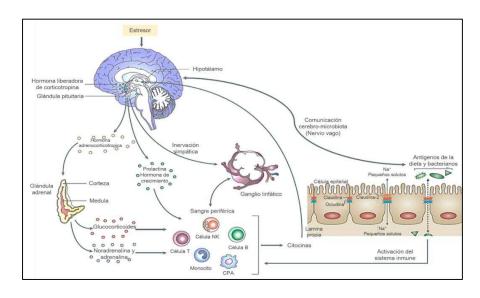
# 3.4. Respuesta fisiológica al estrés

Las manifestaciones fisiológicas debidas al estrés son el resultado de una compleja respuesta del Sistema Nervioso Central(SNC) y la coordinación de este sobre el sistema autónomo, endocrino e inmune. El SNC involucra áreas cerebrales como la amígdala, la cual envía eferencias al hipotálamo, región donde se identifican los estímulos aversivos y se procesa la expresión emocional; El *locus coeruleus*, núcleoque se activa por serotonina y acetilcolina, provocando la liberación de noradrenalina en la corteza cerebral, en el hipotálamo, en la médula espinal y en sistema simpático periférico contribuyendo a las manifestaciones conductuales del alerta y ansiedad (Ramírez, 2007). También, se localizan los principales efectores de la respuesta al estrés en el PVN del hipotálamo, el lóbulo anterior de la glándula pituitaria y la glándula adrenal, son estructuras cerebrales que forman parte del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (Smith y Vale, 2006).

El eje Hipotálamo-Pituitaria- adrenal (HPA) está involucrado en la mediación de la respuesta al estrés y el factor liberador de corticotropina (CRF) regula y controla este eje (**Figura 1**); Además, tiene potentes efectos en la vía intestinal como la modulación de la inflamación, incremento de la permeabilidad y regulación de la motilidad intestinal. El CRF es un péptido de 41 aminoácidos que es liberado en la glándula pituitaria, induciendo la liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) en la corteza adrenal donde estimula la síntesis y liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y glucocorticoides como el cortisol (hormona del estrés), los cuales son efectores del eje HPA y regulan los cambios fisiológicos a través de receptores intracelulares distribuidos en el organismo (Carrasco y Van de Kar, 2003; Smith y Vale, 2006; Konturek et al., 2011).

En respuesta al estrés, se genera un incremento en la actividad del eje HPA, causando aumento de los glucocorticoides circulantes (Ramírez, 2007). También, participa en la modulación del sistema inmune por medio de la activación o inhibición de factores de transcripción que se unen con genes relacionados con la actividad proinflamatoria (Webster et al., 2002). Además, las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), ACTH, cortisol, hormona del crecimiento y prolactina influyen en

eventos y emociones negativas induciendo cambios en el sistema inmune. La modulación inmune por estas hormonas puede ser por la vía directa, a través de la unión de la hormona a su receptor, o indirectamente, induciendo una desregulación de la producción de citocinas (Farhadi et al. 2007), la cual se ha dividido en dos categorías: las células Th1 son mediadoras de la respuesta inmune celular a través de la actividad de los linfocitos citotóxicos, NK y macrófagos e incluye la producción de IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-2 e IL-12. Por otro lado, las células Th2 son mediadoras de la respuesta inmune humoral, favorecen las reacciones inmunológicas mediante anticuerpos (IgG, IgE) e incluyen la producción de IL-4, -5, -6 y -10 (Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005). También, los mastocitos en el tracto gastrointestinal funcionan como efectoras del eje cerebro-intestino, los cuales se activan con un estímulo estresante liberando neurotransmisores y moléculas proinflamatorias como histamina, triptasa, prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, MCP, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (Farhadi et al.,2007).



**Figura 1.** Respuesta fisiológica al estrés por el SNC y su relación con el sistema endocrino, inmune y entérico(Tomado de Glaser y Kiecolt glaser, 2005 y Turner, 2009 con modificaciones).

# 3.5. Fisiología y función del Intestino

El sistema digestivo se compone del tracto gastrointestinal o canal alimentario que consiste en la cavidad oral, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino

grueso, recto y ano; Así como de órganos accesorios como son la lengua, dientes, páncreas, hígado y vesícula biliar (Segarra, 2006).

En el caso del intestino delgado, se extiende desde el píloro hasta la unión del ciego con el colon ascendente. Su longitud es de 6 a 7m y se encuentra dividido en duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno deriva del latin *duodeni*, que significa 12, ya que mide 12 *traveses* de dedo (25 cm). Es la porción más corta, ancha y fija. Aunque no existe un límite de separación claro entre el yeyuno e íleon (Pérez, et al., 2012). Respecto al intestino grueso, es la parte final del aparato digestivo, y comprende desde el íleon terminal hasta el canal anal. Su longitud va desde de 1.35-1.50m, su diámetro es de 7.5 cm en la parte inicial y de 4-2.5 cm en la parte final. Está dividido en colon ascendente (cuyo primer tramo se llama ciego), transverso, descendente, sigmoideo y recto.

La estructura del tracto gastrointestinal varía de una región a otra. Sin embargo, existen características comunes en la organización del tejido que forma las paredes del tubo digestivo. Es decir, las paredes del estómago, del intestino delgado y grueso son similares y se pueden distinguir cuatro capas (**Figura 2**).

- a) Mucosa, es la capa que entra en contacto directo con el lumen, está formada por células especializadas en la absorción (enterocitos), se encuentra diseñada para incrementar la superficie de absorción intestinal y se subdivide:
  - a. Epitelio: se proyecta hacia la superficie intestinal para hundirse formando vellosidades (son más altas en el duodeno y yeyuno, y se acortan progresivamente hacia el íleon y colon) y entre cada una de estas encuentran glándulas tubulares llamadas criptas o glándulas de Lieberkuhn, las cualés están formadas por células argentofilas, células caliciformes secretoras de moco, células de Paneth y células enteroendocrinas productoras de hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina, colecistocinina, somatostatina, enteroglucagon, motilina, neurotensina, y péptido inhibidor gástrico) (Gal et al., 2007; Pérez et al., 2012).

- b. Lamina propia: Compuesta por fibroblastos, células plasmáticas, células musculares lisas, fibras colágenas y elásticas. En esta lámina se producen varios mediadores (citocinas), además las células plasmáticas producen inmunoglobulinas (Pérez et al., 2012).
- c. *Muscularis mucosae*: es una banda de tejido muscular liso y de fibras elásticas.
- b) Submucosa: es una vía por la que atraviesan capilares y vasos de mayor calibre sanguíneo, además se encuentra el plexo de Meissner formado por una red de células nerviosas. En el duodeno se encuentran las glándulas de Brunner, que se encargan de la secreción de líquido alcalino, rico en bicarbonato y moco, el cual protege la mucosa duodenal de la erosión por el ácido y la pepsina del quimo (Pérez et al., 2012).
- c) Muscular: Posee dos bandas musculares, la interna que se dispone de manera circular y la externa longitudinalmente. La contracción de la capa muscular interna disminuye el diámetro del lumen y la contracción de la longitudinal lo acorta. Entre estas dos capas se encuentra el plexo mientérico o plexo de Auerbach. Estos último plexos forman el sistema nervioso entérico, el cual es controlado por el sistema nervioso autónomo (Gal et al., 2007).
- d) Serosa o adventicia: Mesotelio que cubre tejido conectivo y contiene vasos sanguíneos y nervios (Ferrufino et al., 1996).

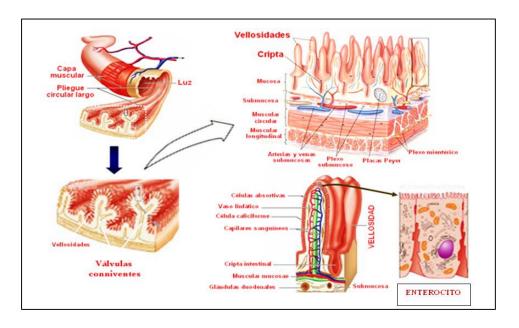


Figura 2. Fisiología del intestino (Tomado de <a href="www.saluduncional.wordpress.com">www.saluduncional.wordpress.com</a>)

Sin embargo, cada región intestinal presenta características funcionales propias, es decir, en el duodeno y yeyuno se lleva a cabo la mayor absorción de nutrientes, ya que en los primeros centímetros del duodeno, se mezclan con las secreciones pancreáticas ricas en enzimas como endopeptidasas (tripsina, quimiotripsina) que actúan sobre enlaces peptídicos internos de las proteínas, mientras que las exopeptidasas hidrolizan los aminoácidos en la región amino y carboxilo terminal, y las sales biliares que permiten la absorción de lípidos; También, hay secreción de moco alcalino que permite proteger la mucosa de la ácidez del quimo proveniente del estómago. Mientras, que en el íleon se lleva a cabo principalmente, la absorción de agua que depende de la osmolaridad del quimo respecto a la del plasma y de vitamina B<sub>12</sub>. En el caso del colon, entre sus funciones se encuentran el almacenamiento de materia fecal, absorción de electrolitos, principalmente Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup>, yagua por osmosis o de forma paralela al Na<sup>+</sup>. Además, hay secreción de HCO3<sup>-</sup> que se intercambia por un ion de Cl<sup>-</sup> para favorecer la alcalinidad del medio. También, hay absorción de vitamina K (Gal, et al., 2007; Pérez et al., 2012).

# 3.5.1. Eje Cerebro – Intestino

El eje cerebro-intestino está en constante comunicación de forma bidireccional, la cual es crítica para mantener la homeostasis. La comunicación entre este eje incluye al SNC, endocrino e inmune, los brazos simpático y parasimpático del sistema nervioso autónomo (SNA), el sistema nervioso entérico (SNE), y por supuesto la microbiota intestinal (**ver Figura 1**). Estos componentes interactúan para formar una red compleja con fibras aferentes que se proyectan a las estructuras integrativas del SNC y proyecciones eferentes al músculo liso. A través de esta red de comunicación, las señales del cerebro pueden influir en la motilidad, absorción y secreción del TGI y por el contrario, los mensajes viscerales del tracto gastrointestinal (TGI) pueden influir en la función cerebral (O'Mahoney et al., 2012).

### 3.5.1.1. Sistema nervioso entérico

El SNE, también llamado "pequeño cerebro", está formado por el plexo mientérico y plexo submucoso (**Figura 2**). Constan de tres categorías funcionales de neuronas: sensoriales, responden a estímulos mecánicos y químicos, transmitiendo información sobre la concentración de glucosa, pH y osmolaridad del contenido luminal, así como el grado de distensión de la pared del tracto y el movimiento del contenido luminal. Interneuronas que la llevan la información hacia las neuronas motoras que pueden dividirse en excitatorias e inhibitorias (Trujillo et al., 2012; Gal et al., 2007). Al activarse este complejo neuronal con múltiples redes de neurotransmisores incluyendo serotonina (5HT), acetilcolina y CRF, se puede incrementar la motilidad y permeabilidad colonica y estimular diarrea en roedores (Taché y Perdue, 2004).

### 3.5.1.2. Microbiota del intestino

Esta se encuentra involucrada en el eje cerebro-intestino (**Figura 1**), siendo el nervio vago una importante línea de comunicación entre la microbiota del intestino, el eje HPA y el SNC (Cryan y Dinan, 2012; Grenham et al., 2011; Forsythe, 2013).

Aproximadamente 100 trillones de bacterias constituyen la microbiota intestinal (Forsythe, 2013), la cual es esencial para una función normal del intestino ya que tiene diversas funciones, entre ellas protectoras previniendo la colonización por patógenos a través de la microbiota residente (siendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los géneros más importantes) porque compiten por los nutrientes. Entre las funciones estructurales se encuentran la fortificación de la barrera y entre las funciones metabólicas se encuentra la síntesis de vitaminas y absorción de iones (Demaude et al., 2006; Grenham, 2011).

La microbiota se comunica con el eje cerebro-intestino a través de diferentes mecanismos: 1) interacción directa con las células de la mucosa (mensaje endocrino), 2) vía células inmunes (mensaje inmune), 3) vía contacto terminaciones neuronales (mensaje neuronal) (Rhee et al., 2009).

# 3.5.2. Función del epitelio intestinal

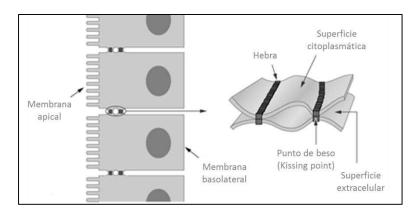
El epitelio intestinal tiene dos funciones, la primera función actuar como una barrera para impedir el paso de agentes nocivos incluyendo antígenos extraños, microorganismos y sus toxinas. Su segunda función es la de actuar como un filtro selectivo que permite la translocación de nutrientes esenciales en la dieta, electrolitos y agua desde la luz intestinal a la circulación (Blikslager et al., 2007; Zendejas y Huerta, 2010; Robinson, 2015), ya que hay una variedad de agentes en el lumen del intestino que pueden iniciar o perpetuar inflamación de la mucosa si cruzan la barrera epitelial (Holmes et al., 2006).

El epitelio intestinal media la permeabilidad selectiva mediante dos vías: transcelular, asociada con el transporte de nutrientes a través de las células epiteliales mediante transportadores y la vía paracelular, asociada con el transporte en el espacio entre células epiteliales, muestra pequeñas diferencias en cuanto a la selectividad iónica y cambia enormemente en términos de la resistencia eléctrica entre los epitelios y es regulado por complejos intercelulares localizados en la membrana apical-lateral. El contacto entre las células epiteliales incluye tres componentes estructurales: uniones fuertes o estrechas (TJ), uniones adherentes

(AJ) y desmosomas (Farquher y Palade, 1963; Groschwitz y Hogan, 2009; Zendejas y Huerta, 2010).

### 3.5.3. Uniones fuertes o estrechas

Las uniones fuertes se identificaron por primera vez por microscopía electrónica como un tipo de unión intercelular. Aparecen como una serie de sitios discretos de la fusión de membranas (denominado punto de besos) (ver **Figura 3**), están situadas en la zona apical de la membrana y funcionan como valla entre la membrana apical y basolateral. (Tsukita y Furuse, 1999; Günzel y Yu, 2013).

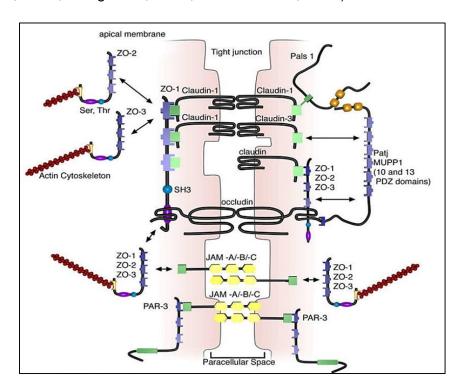


**Figura 3.** Dibujo de las uniones estrechas(Tomado de Tsukita y Furuse, 1999).

De acuerdo con la **Figura 4**, las uniones fuertes o estrechas tienen una organización conformada por 40 diferentes proteínas como:

- 1) Proteínas citósolicas: sirven como proteínas estructurales o de anclaje como ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina, MUPP1.
- 2) Proteínas de regulación del tráfico vesicular, involucradas en la señalización y polaridad celular e incluso en la regulación de la expresión génica.
- Proteínas transmembranales como claudinas, ocludina, tricelulina y moléculas de adhesión (JAM).

Las proteínas transmembranales como ocludina y claudinas son las unionescélulacélula más apicales, creando una barrera de transporte paracelular que permite el control de paso de iones, agua y otras moléculas para mantener la polaridad celular (Feldman et al., 2005;Blasig et al., 2011; Dhawan et al., 2011).



**Figura 4.** Localización celular de las uniones fuertes(Groschwitz y Hogan, 2009).

Sin embargo, las propiedades de permeabilidad de las uniones fuertes son variables en diferentes epitelios, dependiendo de los requerimientos fisiológicos para el transporte de solutos (Gumbiner, 1993). Además, las uniones se abren y cierran en respuesta a una variedad de estímulos como el estado de dietético, señales neuronales y humorales, mediadores inflamatorios, productos de mastocitos y una variedad de vías celulares que pueden ser usurpadas por patógenos (Arrieta et al, 2006). También, limitan el flujo de solutos a lo largo de la vía paracelular permitiendo el flujo de solutos pequeños y iones mediante la formación de poros (Förster, 2008; Gumbiner, 1993), por lo que son cruciales en la generación de gradientes electroquímicos necesarios para procesos de transporte vectorial como absorción y secreción ya que la resistencia transepitelial (TER) está determinada por las

propiedades de las uniones fuertes presentes en el epitelio. Esto permite distinguir epitelios de fuga o semipermeables (*Leaky*) que presentan menor cantidad de uniones fuertes y por tanto menor resistencia transepitelial, mientras que los epitelios apretados o impermeables (*Tight*) poseen gran cantidad de uniones estrechas y por tanto alta TER. Además, actúan como intermediarios y transductores en los mecanismos de señalización celular, en procesos de polaridad, diferenciación, crecimiento y proliferación celular (Zendejas y Huerta, 2010; Anderson y Van Itallie, 1995).

La expresión de las proteínas de unión fuerte en el intestino es altamente regulada y dependiente del compartimento intestinal (intestino delgado o grueso), su localización vellosidad/cripta y especificidad de la membrana celular (apical, lateral, basolateral). El complejo patrón de expresión de estas proteínas en el intestino está relacionada con las funciones específicas de una región intestinal particular y su localización (Groschwitz y Hogan, 2009).

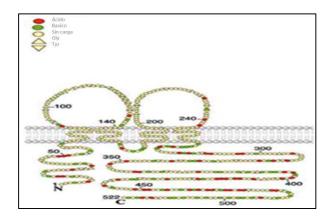
#### 3.5.3.1. Ocludina

Fue la primera proteína de unión fuerte en ser identificada. Se encontró en el pollo como antígeno de los anticuerpos monoclonales generados contra una fracción de unión aislada de hígado de pollo. Es una proteína de aproximadamente 60 kDa, presenta una estructura con cuatro dominios transmembrana, el primer bucle tiene alto contenido de residuos de tirosina y glicina (60%). También, tres dominios citoplasmáticos (dominio largo Carboxilo-terminal, dominio corto-N terminal y una vuelta intracelular corta)(ver **Figura 6**) (Tsukita y Furuse, 1999; Harhaj y Antonetti, 2004).

El dominio terminal carboxilo interactúa con el dominio PDZ de la proteína ZO-1, la cual es requerida para anclar ocludina al citoesqueleto de actina. Muchas isoformas de ocludina han sido identificadas y son el resultado de splicing alternativo de mRNA, estas variantes alteran la distribución subcélular e interactúan con otras TJ. La función de ocludina no ha sido completamente delineada; Sin embargo, *datos in* 

*vitro e in vivo* sugieren un papel en la regulación de la permeabilidad paracelular (Groschwitz y Hogan, 2009).

La ocludina de ratón tiene 521 aminoácidos. El primer dominio extracelular podría estar involucrado en la interacción célula-célula conteniendo dominios ricos en tirosina y glicina, aminoácidos ácidos, básicos y neutros. Un segundo dominio funcional es el carboxilo terminal (150 aminoácidos), el cual es responsable de la asociación de ocludina con ZO-1 (Förster, 2008; Ando-Akatsuka et al., 1996). En el caso de la ocludina humana, contiene 522 aminoácidos, tiene un dominio citoplasmático N-terminal con 66 aminoácidos y un C-terminal con 256 aminoácidos. El primer bucle extracelular tiene 50 aminoácidos es rico en glicina y tirosina, estos últimos forman interacciones hidrofóbicas, mientras que glicina provee flexibilidad. El segundo bucle extracelular tiene alrededor de 45 aminoácidos contiene dos cisteínas, las cuales podrían formar puentes disulfuro en un ambiente oxidativo en el intersticio. El bucle intracelular (aproximadamente 10aminoácidos) revela un exceso de aminoácidos básicos, aunque la estructura y función de los bucles aún no es muy claro (Blasig et al., 2011). Además, la localización de ocludina es regulada por quinasas como tirosina quinasa c-Yes y PKC, y fosfatasas como serina/treonina fosfatasa A2 que fosforilan sitios potenciales en tirosina, serina y treonina (Feldman et al., 2005; Groschwitz y Hogan, 2009; Suzuki, 2013).



**Figura 6.** Representación esquemática de la estructura de ocludina(Tomado de Förster, 2008)

# 3.5.5.2 **Claudinas**

El nombre Claudina deriva del latín "claudere" que significa cerrar (Singh et al., 2010) son el mayor componente estructural de las uniones fuertes presentes en las membranas de las células epiteliales y endoteliales; Interesantemente, las claudinas son homologas a las subunidades γ de canales de calcio.

Las claudinas son una familia de 24 miembros distribuidas en diferentes tejidos, son pequeñas proteínas (20-27 kDa) (en el ratón es una proteína de 211 aminoácidos) que tienen cuatro segmentos transmembrana (ver Figura 7), el primer bucle extracelular es hidrofóbico con 49-52 residuos conservados W-GLW-C-C, respecto al segundo bucle extracelular que es pequeño de 16-33 residuos, además se encuentran separados por un pequeño bucle intracelular de 15 aminoácidos; El dominio citoplasmático Carboxilo-terminal tiene sitios de fosforilación, los cuales varían entre 23 a 56 aminoácidos, están enriquecidas en serina, treonina, tirosina, prolina y residuos básicos, aunque la secuencia tirosina-valina es dominio de interacción con PDZ con excepción de claudina-12, la cual no presenta dicha interacción (Harhaj y Antonetti, 2004; Singh et al., 2010; Van Itallie, et al., 2012).

Es útil dividir las claudinas en tres grupos de acuerdo con su función: constructores de barrera, formadores de poros y con función ambigua (Amasheh et al., 2011). Por ejemplo claudina-1,-3,-4,-5,-7, -8,-9 y -14 disminuyen la permeabilidad intestinal y son referidas como formadoras de barrera, mientras que claudina-2,-7,-12 y -15 incrementan la permeabilidad y generalmente son mencionadas como formadoras de poros con un diámetro de 8-9 A° aproximadamente (Robinson et al., 2015). Además, interaccionan homofílicamente (Claudina-1, -2, -3, 5, -6, -9, -11, -14 y -19) o heterofílicamente (claudina-3/ Claduina-1. -2 y -5) (Groshwitz y Hogan, 2009). Aunque, la selectividad de carga de las claudinas es determinada por la carga neta de los aminoácidos en el primer bucle extracelular (Elkouby y Yosef, 2010). Por ejemplo, Claudina-15 presenta dos residuos cargados negativamente en la posición 53 y 64, y una sustitución de los mismos por residuos positivos, convierte a dicha claudina permeable de cationes a aniones (Colegio et al., 2002). Muchas claudinas, contienen sitios de fosforilación serina/treonina en el dominio citoplásmatico c-

terminal y están relacionados con aumento o disminución de la función barrera (Van Itallie y Anderson, 2006).

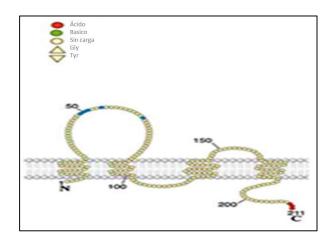


Figura 7. Estructura general de la familia de claudinas (Tomado de Förster, 2008).

Cabe destacar que la expresión de estas proteínas es diferente en cada segmento intestinal, así como en humano y ratón (**Cuadro 1**). Esta expresión diferencial de claudinas en el tracto gastrointestinal es probable que contribuya a la diversidad de TER y al flujo paracelular de iones (Liu et al., 2013).

Cuadro 1. Expresión de claudinas en el intestino humano y de ratón.

Segmento	Expr	Referencias	
	Humano	Ratón	
Duodeno	1,2,3,4,5,7,12,15	2,3,7,15	Fujita et al., 2006;
Yeyuno	No determinada	2,3,7,12,15	Holmes et al., 2006;
Íleon	2,7,8,12,15	1,2,3,4,7,8,12,15	Lei et al., 2012;
Intestino grueso	1,3,4,7,8,12,15	1,2,3,4,5,7,8,12,	Lameris et al., 2013
		13,15	

### 3.5.4. Regulación de las uniones fuertes

Además, las funciones de las uniones fuertes son reguladas por la vía de traducción de señales (ver **Figura 5**) que son desencadenadas por agentes exógenos como las toxinas bacterianas, constituyentes de la dieta, y factores endógenos como las citocinas proinflamatorias (TNF-α, IFN-γ e IL-1, -2, -4, -6, -8, -13 y -17) y factores de crecimiento (EGF, TGF-β, HGF, PDGF), los cuales alteran la expresión y/o inducen modificaciones de post transcripción, fosforilación, glicosilacion y /o ubiquitinación y tienen un profundo impacto en la permeabilidad de la barrera (Heiskala et al., 2001; Capaldo y Nusrat, 2009; Robinson et al., 2015).

Existen evidencias de que la regulación de la expresión génica de las proteínas de unión fuerte por la vía de señalización Wnt es parte del mecanismo esencial para la diferenciación de las células epiteliales. La activación de Wnt lleva a la estabilización de β-catenina, la cual transloca al núcleo celular y regula la expresión génica en asociación con LEF, TCF de la familia de factores de transcripción, así mismo los factores como Snail, Cdx-2, HNF-α y GATA-4 pueden unir regiones promotoras de varios genes de claudinas afectando su expresión (Singh et al., 2010). Respecto a Snail es un factor de transcripción que se une directamente a promotores de claudinas e influye en su expresión génica (Van Itallie y Anderson, 2006). Además, existen diferentes vías de señalización como la vía de la PKC que afecta las barreras endoteliales y epiteliales. Es en una familia de quinasas específicas de serina/treonina, donde se encuentran PP1 y PP2, esta última puede ser activada por triptasa modulando la expresión de proteínas de unión fuerte (Farhadi et al.,2007), ambas interaccionan con el tallo terminal carboxilo de ocludina, mientras que la primera desfosforila en residuos de serina, PP2A desfosforila residuos de treonina. Otra familia involucrada en la regulación de las uniones fuertes son GTPasas Rho, incluye RhoA, Rac y Cdc42. Entre los efectores que regulan hacia abajo a Rho se encuentran las quinasas ROCKs, que pueden desencadenarla fosforilación de MLC2 vía independiente de MLCK, desmontar las uniones fuertes e incrementar la permeabilidad paracelular. Por otro lado, también se encuentra involucrada en la regulación la MAP, ERK, JNKs, las cuales responden a estímulos extracelulares como a factores de crecimiento y estrés; Estas, son capaces de modular el transporte paracelular de las uniones fuertes aumentado o disminuyendo la regulación de la expresión de varias proteínas de unión fuerte como ocludina (González-Mariscal et al., 2008).

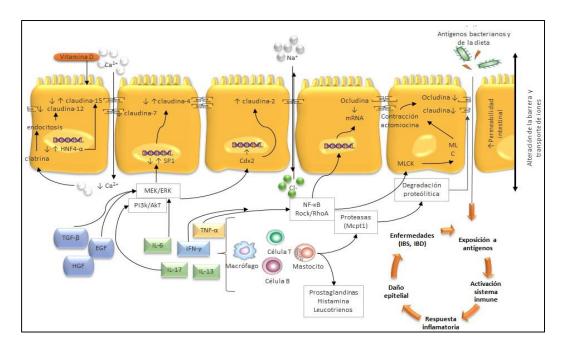


Figura 5. Regulación de la expresión de proteínas de unión fuerte (Fuente original Groschwitz y Hogan, 2009 con modificaciones).

# 3.5.5. Relación de las proteínas de unión fuerte y enfermedades gastrointestinales

Una barrera intestinal defectiva, así como el cambio en la expresión de proteínas de unión fuerte a lo largo del intestino define las propiedades particulares en cada segmento intestinal y puede contribuir a la patofisiología de diferentes enfermedades (ver **Cuadro 2**) (Bücker et al., 2010).

Cuadro 2. Expresión de proteínas de unión fuerte y su relación con enfermedades gastroi

Proteína (PM)	Función	Teji	do	Relación con	enfermedades	
		Humano	Ratón	Expresión disminuida	Expresión elevada	
Ocludina (65 kDa)	Función ambigua Permeabilidad paracelular	Intestino	Intestino (duodeno, íleon, colon)	CU CC CD IBS		F€
Claudina-2 (~25kDa)	Permeabilidad de cationes monovalentes (Na+, K+, Li+). Formación de poro de agua (diámetro 2.8 A°)	Criptas intestinales	Intestino (duodeno, íleon, colon)	CU IBS Absorción de vitamina D dependiente de Ca <sup>2+</sup>	CD IBS	Ar k : F
Claudina-4 (~22kDa)	Formación de barrera Reducción de la permeabilidad de cationes Blanco para la toxina producida por Clostridium perfringens	Intestino	Intestino (íleon, colon)	CU CC IBS	Cáncer gástrico, colorectal	Ar A Ba H

perfringens

Abreviaturas: CU: Colitis ulcerativa; CC: Colitis colagenosa; CD: Enfermedad de Crohn; IBS: Síndrom IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal.

Cuadro 2. Expresión de proteínas de unión fuerte y su relación con algunas enfermedades gastrointestinales (Continuación...)

Proteína (PM)	Función	Tejido		Relación con enfermedades	
		Humano	Ratón	Expresión disminuida	Expresión elevada
Claudina-7 (~24kDa)	Función ambigua permeabilidad paracelular de Na+ y Cl- Importante en la transducción de señales	Intestino	Duodeno, yeyuno, íleon, colon	Enfermedad celiaca CU	Ratones knock- out: Muerte por deshidratación. Cáncer de estómago, colon.
Claudina- 12 (~27kDa)	Función ambigua Incrementa el transporte de Ca <sup>2+</sup> Absorción de vitamina D	Duodeno, yeyuno, íleon, colon	Intestino (yeyuno, íleon, colon)		Carcinoma colorectal
Claudina- 15 (~23kDa)	Incrementa la permeabilidad de cationes Indirectamente absorción de glucosa	Intestino	Intestino (duodeno, íleon, colon)	Enfermedad celiaca IBD Megaintestino	Absorción de glucosa en adultos

Abreviaturas: CU: Colitis ulcerativa; CC: Colitis colagenosa; CD: Enfermedad de Crohn; IBS: Síndrom IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal.

### 3.6. Tratamiento farmacológico para el estrés

El tratamiento al estrés es complejo ya que se deben considerar tanto los aspectos neurobiológicos como los psicosociales.

Entre los medicamentos más empleados se encuentran los benzodiacepinas, las cuales tienen propiedades ansiolíticas a dosis bajas y con efectos sedativo-hipnóticas a dosis altas. También, se emplean los ISRS como la fluoxetina que se ha demostrado que previene los efectos del estrés en ratas inmovilizadas (Gambarana et al., 1995).

Sin embargo, los probióticos han emergido como terapias potenciales para desordenes gastrointestinales relacionados con el estrés como el IBS ya que su mecanismo de acción es multifacético, puede incluir lo siguiente: la prevención de sobrecrecimiento bacteriano, proveer una barrera física a las bacterias patógenas, modificando el pH intestinal, modulando el sistema inmune a través del incremento de la IgA o regulación de citocinas (Boirivant y Strober, 2007). Por ejemplo, la administración de *L. Plantarum* mostró el incremento de ZO-1 y ocludina en el duodeno de voluntarios sanos (Karczewski et al., 2010). También, la administración de *L. paracasei* NCC2461 reduce la hipersensibilidad visceral en modelo preclínico de IBS en ratón (Grenham, 2011).

En el caso de tratamientos para inhibir la sobreregulación de claudina-2 en enfermedades intestinales involucran terapias anti-TNF-α para pacientes con IBD. También, la administración de Adalimumab inhibe TNF-α e induce cambios en la expresión de claudina-1,-2,-4 y ocludina. Otra posibilidad para proteger la barrera intestinal incluye tratamientos con butirato, un ácido graso de cadena corta producido por fermentación bacteriana de carbohidratos en el colon. Un componente natural es el alcaloide berberina que tiene efectos protectores, en la medicina tradicional se emplea como tratamiento de diarrea y gastroenteritis, causa una regulación a la baja de claudina-2 (Luettig et al., 2015).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés ha pasado a formar parte de nuestra vida diaria y es considerado un factor predisponente y en algunos casos desencadenante para el desarrollo de una gran diversidad de enfermedades gastrointestinales comoreflujo gastroesofágico, úlcera péptica, colitis, enfermedad de Crohn, IBS.

Estas enfermedades, se relacionan con modificaciones en la expresión de proteínas de unión fuerte como ocludina y claudinas que son importantes en la regulación del epitelio intestinal. De hecho, se han realizado diferentes estudios con la finalidad de demostrar el efecto de diferentes tipos de estrés como el agudo en proteínas de unión fuerte, sin embargo, no existen estudios sobre el efecto del estrés crónico en ratones BALB/c sobre la expresión de ocludina y claudinas en términos de regionalización intestinal.

Lo anterior nos permite establecer las siguientes preguntas de estudio:

¿El estrés psicológico, crónico, de gran intensidad, desencadenado por la inmovilización de las cuatro extremidades y la cola por 2 horas durante 4 días altera la expresión de las uniones fuertes en el tracto intestinal, a nivel génico y protéico? ¿Existe alguna regionalización sobre la respuesta al estrés en el tracto intestinal?

# 5. HIPÓTESIS

El estrés crónico en ratones hembra BALB/c producirá una disminución en la expresión transcripcional y proteica de moléculas de unión fuerte como son la ocludina y claudinas en el duodeno, íleon y colon.

## 6. OBJETIVOS

## 6.1. General

Evaluar en ratones hembra BALB/c el efecto del estrés crónico sobre algunos parámetros (expresión de proteínas de unión fuerte) relacionados con la homeostasis y la función de la barrera intestinal (epitelio).

## 6.2. Particulares

Evaluar en el duodeno, íleon y colon de ratones hembra BALB/c sometidas a estrés crónico los siguientes parámetros:

- 1. La expresión de mRNA de ocludina y claudinas -2, -4, -7, -12 y -15.
- 2. La expresión proteica de la ocludina y claudinas -2, -4, -7, -12 y -15.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 7.1. Animales

El estudio se realizó con ratones hembra BALB/c proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco (UAM-X), siguiendo todas las normas establecidas en el "Manual de Organización y Procedimientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio".

Se emplearon animales de 6 semanas de edad con un peso entre 18-20 g. Los ratones se colocaron en cajas con 6 animales cada una, proporcionándoles agua ad libitum y alimento (LabDiet 5015 St Louis Missouri); permanecieron bajo condiciones ambientales convencionales a temperatura constante de 22-24°C y ciclos de luz-oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 7 am y se apagarán a las 7pm). Un grupo de 12 ratones hembras BALB/c fue dividido en un grupo control (n=6) y un grupo estresado (n= 6). Previó al protocolo de estrés, ambos grupos de se mantuvieron en adaptación al medio ambiente, durante la semana 6 y 7 de vida.

#### 7.2. Modelo de estrés

A partir de la semana 8 de vida, los ratones fueron sometidos al protocolo de estrés. Se trabajó con el modelo de estrés por inmovilización, que consistió en colocar al ratón en posición prona (boca abajo) sobre una superficie plana, sujetando las cuatro extremidades con cinta adhesiva. Dicho modelo se aplicó en sesiones de 2 h de inmovilización por 4 días consecutivos.

## 7.3. Recolección de las muestras de mucosa del intestino

Los ratones fueron expuestos a isoflurano, para inducir la pérdida de la conciencia, posteriormente se inmovilizaron en posición supina (boca arriba) con cinta adhesiva sobre una tabla de unicel para ser sangrados por punción cardiaca. A continuación, se aplicó benzal en la región abdominal para cortar la piel y la membrana peritoneal, y remover el tracto gastrointestinal. El intestino delgado se corta en porciones de 5 cm de las siguientes regiones: duodeno que corresponde a la región unida al estómago e íleon que se encuentra unida al ciego. También, se cortó el colon. Cada

porción intestinal fue cortada longitudinalmente exponiendo la superficie luminal, para recolectar la mucosa total por raspado. Posteriormente se almacenó a -70 °C hasta su análisis.

#### 7.4. Extracción de RNA

A la muestra de mucosa de cada región intestinal, se le agregaron 800  $\mu$ L de trizol Tri Reagent® (No. Cat TR 115 Molecular Research Center, Inc) y se homogenizó. Después, se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo grado molecular (Sigma-Aldrich, USA) y se mezcló por inversión. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 18 000 x g por 15min a 4°C, durante este paso se formaron tres fases: fase orgánica (inferior) que contiene las proteínas, la interface que contiene DNA y la fase acuosa (superior), la cual contiene el RNA total. Esta última fase se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol, y se incubó 20 min a -70°C. Posteriormente, se centrifugó a 18 000 x gpor 15min a 4°C. El sobrenadante se decantó en un solo movimento. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 75% y se centrifugo 18 000 x gpor 5 min a 4°C. El botón de RNA obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 20- 80  $\mu$ L de agua inyectable estéril (el volumén dependió del tamaño del botón) y se almacenó a -70°C hasta el análisis. Por último, se determinó la concentración y pureza del RNA total empleando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific Wilmington, USA).

#### 7.5. Síntesis de cDNA

A partir del RNA total obtenido de cada una de las regiones intestinales se sintetizó el cDNA como sigue: en un microtubo de 200 μL, se agregó el equivalente a 2μg de RNA total, 1μl de Oligo de T (Promega Corporation, Wisconsin, USA) y se completó a un volumen total de 15μl con agua inyectable estéril. Dicha mezcla se calentó a 70°C durante 5 min en el termociclador (*TPersonal* Whatman Biometra, Germany). Posteriormente, el tubo se colocó en hielo y se adicionaron 5μL del buffer de la enzima (Promega Corporation, USA),

1μl de la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega Corporation, USA), 1.5μl de DNTP's (Promega Corporation, USA) y agua para completar el volumen a 25μl. Por último, el tubo se colocó en el termociclador (Whatman Biometra)con las siguientes condiciones: 60 min a 42°C y descenso de la temperatura a 4°C por tiempo indefinido. Al finalizar la reacción, se cuantificó la pureza y concentración del cDNA en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

# 7.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La amplificación y cuantificación de la expresión génica de ocludina, claudina-2, -4, -7, -12 y 15, así como actina como gen constitutivo, se realizó mediante q-PCR. La secuencia de los iniciadores de las proteínas de unión fuerte (**Cuadro 3**) se diseñó a partir de las secuencias de la base de genes del National Center for Biotecnology Information USA (NCBI) con el programa Primer3 version 0.4.0.

**Cuadro 3**. Secuencia de DNA para síntesis de los iniciadores.

Proteína	Iniciadores
β-actina(Gen constitutivo)	5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCA-3'
	5'-GGATGCCACAGGACTCCAT-3'
Ocludina	:5´ATGTCCGGCCGATGCTCTC-3´
	5'-CTTTGGCTGCTGTTGGGTCTG-3'
Claudina-2	5' GGCTGTTAGGCACATCCAT-3'
	5'-TGGCACCAACATAGGAACTC-3'
Claudina-4	5'-ACAGGTCCTGGGAATCTCCT -3'
	5'-CACTGCATCTGACCTGTCCT-3'
Claudina-7	5' CACACGCCTTTAATCCCAGT-3'
	5'-TGATGTCTCCCAAGTCCACA-3'
Claudina-12	5´ AAGTGGCCGAGGAGGTATTT-3´
	5'-GAGCAGGTCCGCGTTACACA -3'
Claudina-15	5' TGAGGCTTGGCTGTTTCTTT-3'
	5'-AAGCCTGGCAGCTTAAAACA -3'

Para la reacción, en un microtubo de 200  $\mu$ L se adicionaron los siguientes reactivos: 20  $\mu$ L de Master Mix 1.1x (Ampliqon III, Denmark), 1  $\mu$ L de iniciador forward (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L iniciador reverse (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L cDNA (equivalente a 100 ng), 1  $\mu$ L de Eva Green (Biotium Inc.California, USA) y 1  $\mu$ L de agua inyectable estéril para obtener un volumen final de 25  $\mu$ L. Las reacciones se incubaron en el carrusel del Rotor Gene 6000 con capacidad de 36 tubos con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C 10 min, 40 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 15 s, 72°C por 20 s y 1 ciclo para la curva Melt de 72°C por 90 s.

Los datos obtenidos se analizaron con el software RegLinPCR (Version 2015.3, Amsterdam, Netherlands) para obtener los valores de Ct, posteriormente se calculó la expresión relativa de cada gen, empleando el método de 2-ΔΔCt, que consiste:

- a. Obtener los valores de Ct de cada gen para el grupo sin estrés (control) y el grupo estresado (condición).
- b. Calcular el valor de  $\Delta$ Ct para el grupo control y estresado.

 $\Delta Ct = (Gen inducible- gen constitutivo)$ 

Ejemplo:  $\Delta Ct = (Ct \text{ ocludina control} - Ct \text{ actina control})$ 

- c. Calcular el promedio de ΔCt del grupo control y grupo estresado.
- d. Posteriormente, calcular el valor de  $\Delta\Delta$ Ct.

 $\Delta\Delta$ Ct = ( $\Delta$ Ct condición –  $\Delta$ Ct control)

Ejemplo:  $\Delta\Delta$ Ct = ( $\Delta$ Ct ocludina condición -  $\Delta$ Ct control)

e. Calcular 2-ΔΔCt empleando el resultado del cálculo anterior.

### 7.7. Western blot

La expresión proteica de las proteínas de unión fuerte (ocludina, claudina-2, -4, -7, -12 y 15, y actina como proteína constitutiva control se detectaron mediante western blot quimioluminiscente.

### 7.7.1. Extracción de proteínas totales

A las muestras de mucosa total del duodeno, íleon y colon, se le agregaron 500  $\mu$ L de buffer PBS con inhibidores de proteasas (Cat No. 11697498001 Roche Diagnostics, Mannheim Germany). Después, las muestras se homogenizaron con el sonicador a 5000 rpm durante 5 s y se colocaron en hielo por 20 min Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron a 25 000 x g a 4°C durante 10 min, el sobrenadante obtenido se colocó en tubos eppendorf de 200  $\mu$ L. Finalmente, la cuantificación de proteína se realizó en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

#### 7.7.2. Electroforesis SDS-PAGE

Para realizar esta técnica, se procedió a preparar el gel de poliacrilamida al 10% para análisis de ocludina y 12% para claudinas en las placas de vidrio con espesor de 1.5 cm, a continuación, se ensambló el sistema de electroforesis. Se adicionó buffer de corrida (tris, glicina, SDS) entre cada uno de los geles para asegurar que no exista fuga del mismo, después con el mismo buffer de corrida se llenó la mitad de la cubeta de electroforesis.

La muestra de proteínas se preparó en un microtubo de 200 μL con los siguientes reactivos: buffer de elución, agua y muestra (concentración 10 μg). El tubo se calentó en baño María a 85°C durante 5 min. Al terminar dicho tiempo, se colocó en hielo. Posteriormente, se cargaron 30 μL de cada muestra en el pozo correspondiente en el gel, también se cargó el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup>Standars Dual color, BIO RAD, USA)en el pozo 1. A continuación, se cubrió la cubeta y se conectaron los cables correspondientes de los electrodos a la fuente de poder, ésta se programó a 88 V, 0.06 A durante 120 min. Al terminar dicho tiempo, se retiró el gel del sistema y se colocó en buffer de transferencia (tris, glicina, metanol).

#### 7.7.3. Transferencia Semi-húmeda

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon P No. Cat IPV H00010 Milllipore Billerica MA, USA) de 8 x 6 cm, ésta se colocó en metanol 30 s, luego se lavó con agua destilada 2 min, finalmente se colocó en buffer de transferencia. A continuación, en la base de la cámara de transferencia semi-húmeda (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell de BIO RAD) se preparó el sándwich de transferencia de la siguiente manera: papel transferencia (previamente impregnado con buffer) / membrana PVDF/ gel de electroforesis/ papel de transferencia; Para evitar la formación de burbujas en el sándwich, sobre éste se rodó suavemente una pipeta. Después, se tapó la cámara de transferencia, se conectaron los cables correspondientes de los electrodos a la fuente de poder, la cual se programó a 4 V durante 30 min. En el caso de los amperes, se consideró el tamaño de la membrana, es decir, 1 mA por cm² y la cantidad de membranas dentro de la cámara.

#### 7.7.4. Inmunodetección

Al terminar la transferencia, la membrana se retiró de la cámara y se incubó en leche al 5% a temperatura ambiente durante 1 h a 30 rpm. Posteriormente, se realizaron dos lavados con leche al 0.5% con buffer salino-Tris-Tween 20 (TBS-T).

Finalizados los lavados, se procedió a la incubación con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche al 1% en TBS-T: *rabitt* anti-occludin dilución 1:500 (Cat. No. Sc-5562 Santa Cruz biotechnology,Inc Dallas TX, USA), *rabbit* anti-claudin-2 dilución 1:500 (Cat No. SC-133464 Santa Cruz), *goat* anti-claudin-4 dilución 1:1000 (Cat No. SC-17664 Santa Cruz), *goat* anticlaudin-7 dilución 1:1000 (Cat No. SC-17670 Santa Cruz), *rabbit* anti-claudin-12 dilución 1:500 (Cat No.SC-98608 Santa Cruz), *rabbit* anti-claudin-15 dilución 1:500 (Cat No.SC-25712 Santa Cruz) y actina dilución 1:1000, usada como proteína control (No. Cat SC-1615, Santa Cruz), durante 1 h en agitación constante (30 rpm) a temperatura ambiente. Al terminó de dicho tiempo, la membrana se lavó con leche al 0.5% en TBS-T en agitación fuerte (100rpm) de la siguiente manera: tres lavados de 1 min y tres lavados de 7 min. A

continuación, se incubó la membrana empleando una dilución 1:1000 con suero policional de cabra contra la IgG de conejo conjugado con HRP (horseradish peroxidase) (Cat No. 31460 Thermo Scientific, USA) o con suero policional de conejo contra la IgG de cabra conjugado con HRP (Cat. No. 81-1620 Invitrogen California, USA), diluido en leche al 1% en TBS-T, 1 h a temperatura ambiente en agitación continua (30 rpm). Después, a la membrana se realizó tres lavados de 1 min y tres lavados de 7 min con TBS-T. Posteriormente, se incubócon estreptavidina conjugada con HRP (Cat. No. 18-152 Merck Millipore Billerica MA, USA) en leche al 1% con TBS-T durante 45 minutos con agitación constante (30rpm). Luego, se realizaron lavados con TBS-T con agitación constante (100rpm): un lavado de 1 miny 3 lavados de 10 min. Finalmente, el revelado se llevó a cabo agregando 1 mL del Kit quimioluminiscente (dilución 1:1) West Femto (Cat No. Pl 34096 Thermo Scientific, USA) y la detección se realizó en un foto-documentador Fusion SL (Viber Laurmat Marne La Vallee, Francia). Los pixeles de las bandas fueron determinados con el software Fusion Capt Advencec S12 Xpress versión 16.032 (Viber Laurmat Marne La Vallee, Francia).

Para obtener la expresión en unidades relativas de la proteína de unión fuerte ocludina en cada una de las regiones del intestino (duodeno, íleon y colon), se empleó la siguiente fórmula:

$$Unidades \ relativas = \frac{pixeles \ de \ ocludina}{pixeles \ de \ \beta \ actina}$$

En donde, si las unidades son equivalentes a 1, el nivel de expresión de la proteína problema es igual a la expresión de  $\beta$  actina, una proteína constitutiva. Si el valor es > 1, significa que la expresión es mayor que la proteína constitutiva.

### 7.7.5. Desnudamiento ("Stripping")

Al terminar el revelado, la membrana se lavó con agua destilada durante 5 min, luego se incubó con buffer de *stripping*(SDS 10 %, glicina, Tween 20) a temperatura ambiente durante 5 min con agitación fuerte (100rpm). A continuación, se realizaron

dos lavados con TBS-T con agitación fuerte (100rpm). Finalmente, la membrana se utilizó para detectar el resto de las proteínas con los anticuerpos correspondientes.

#### 7.8. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se analizaron con métodos paramétricos. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron con la prueba t de student. Para comparar más de dos grupos, se realizó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados fueron reportados como la media ± error estándar (EE) para los datos de q-PCR y la media ± desviación estándar (DE) para los datos de western blot. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de P <0.05. Los cálculos estadísticos fueron estimados con Prism 5 for Windows Versión 5.01 (GraphPad Software, Inc. California, USA).

#### 8. RESULTADOS

## 8.1. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y extracción de proteínas

La concentración de RNA obtenida de las muestras del grupo de ratones control y el grupo de ratones estresados en duodeno, íleon y colon es mayor a 300 ng/μL en ambos grupos. Por otro lado, la pureza de dichas muestras se estableció de acuerdo con la relación de absorbancia establecida para proteínas (A<sub>260/280</sub>). Los valores de pureza obtenidos para estos parámetros fueron entre 1.6-2.0, tanto en el grupo control como en el grupo estresado en las diferentes regiones del intestino. Estos valores de pureza y concentración fueron adecuados para realizar la reacción de transcriptasa reversa. También, se realizó electroforesis en gel de agarosa para observar la integridad y pureza de cada una de las muestras, en los cuales no se observa contaminación por DNA.

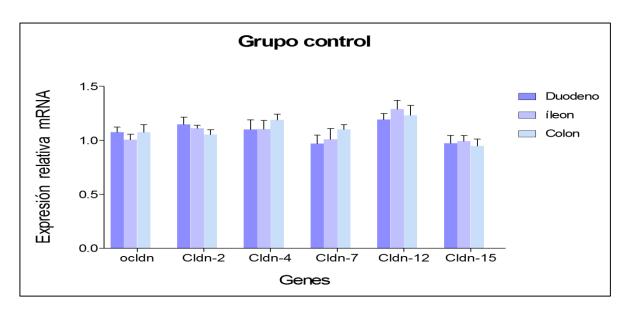
La concentración obtenida de cDNA en cada una de las regiones del intestino, tanto en el grupo control como estresado, se encontró por encima de los 1000 ng/ µL en cada una de las regiones del intestino, el cual es un valor de concentración adecuado para realizar qPCR.

En el caso de las proteínas, al realizar la lectura a 280nm en el equipo Nanodrop se obtuvó una concentración por encima de los 2000 μg/mL para el grupo control y el grupo sometido a estrés.

#### 8.2. Niveles de expresión de proteínas de unión fuerte en el intestino

En la **Figura 8**, se muestra la expresión génica de las proteínas de unión fuerte en cada segmento intestinal del grupo de ratones control para evaluar la expresión basal de cada gen en condiciones fisiológicas.

De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA de una vía, no se observaron diferencias significativas sobre la expresión de mRNA de ocludina y claudina-2, -4, -7, -12 y -15 entre cada segmento intestinal (P<0.05).

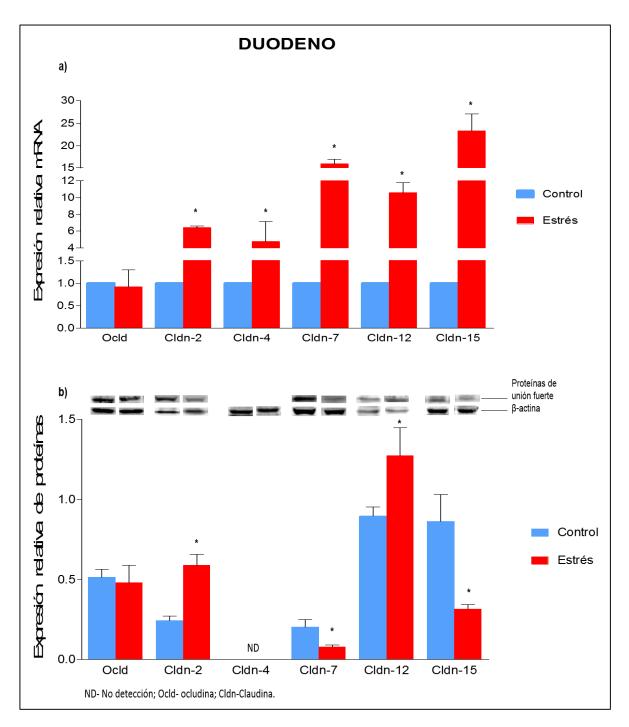


**Figura 8.** Expresión relativa de mRNA del grupo control para los genes de las proteínas de unión fuerte en cada una de las regiones del intestino (n=6) (media ± EE).

# 8.2.1. Expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en el duodeno

En la **Figura 9** se presentan los datos de la expresión génica y proteína de la ocludina y claudinas en el duodeno. Para la determinación de la expresión proteica de ocludina, claudina-2, -4, -7, -12 y -15, se consideró la densidad de las bandas con un PM de 65, 25, 22, 23, 27 y 24 kDa, respectivamente. Mientras que para actina, se consideró la densidad de banda de 43 kDa.

En la región del duodeno, se puede observar que en comparación con el control, el estrés aumento la expresión del mRNA de las claudinas analizadas (P=0.001). En cuanto a la expresión proteica, el estrés aumento la expresión de claudina-2 (P=0.001) y claudina-12, aunque la expresión de esta última no fue estadísticamente significativa; También, el estrés disminuyó la expresión de claudina-7(P=0.032) y claudina-15 (P=0.04); Sin embargo, el estrés no alteró la expresión proteica de la claudina-4 la cual fue indetectable. Además, el estrés no alteró significativamente la expresión génica ni proteica de la ocludina (P>0.05).

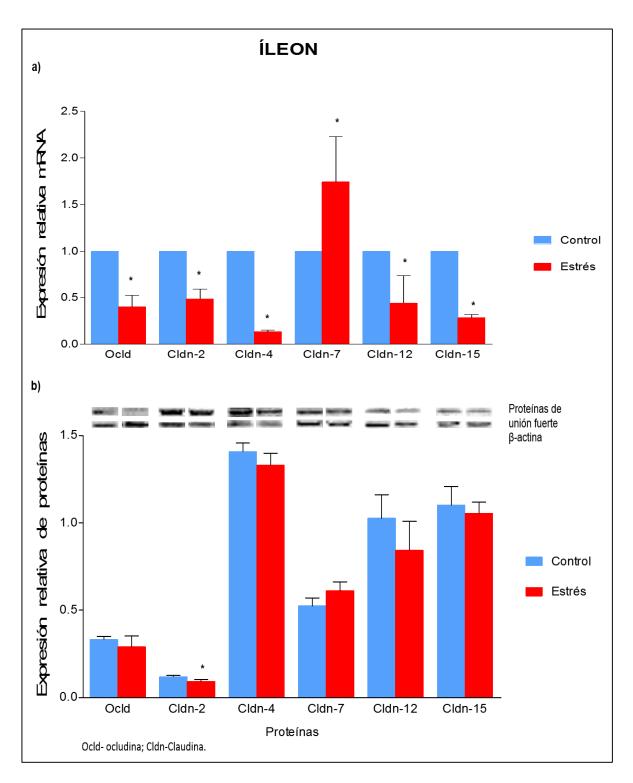


**Figura 9.** Efecto del estrés sobre la expresión de proteínas de unión fuerte en el duodeno de dos experimentos independientes (n=6). a) Expresión génica (media ± EE); b) Expresión de proteínas (media ± DE).

# 8.2.2. Expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en el íleon

En la **Figura 10**, se presentan los datos de la expresión génica y proteína de la ocludina y claudinas en el íleon. Para la determinación de la expresión proteica de ocludina, claudina-2, -4, -7, -12 y -15, se consideró la densidad de las bandas con un PM de 65, 25, 22, 23, 27 y 24 kDa, respectivamente. Mientras que para actina, se consideró la densidad de banda de 43 kDa.

En el íleon, puede observarse que en comparación al control, el estrés disminuyó la expresión génica de la ocludina (P=0.002), claudina-2, claudina-4, claudina-12 y claudina-15 (P=0.001) y aumentó la expresión de claudina-7 significativamente (P=0.002); En cuanto a la expresión proteica, en comparacion a la del grupo control, el estrés no causó cambios significativos en la expresión de ocludina, claudina-4, -7, -12 y -15 (P>0.05). Aunque, se observó disminución de la expresión de claudina-2 (P=0.042).

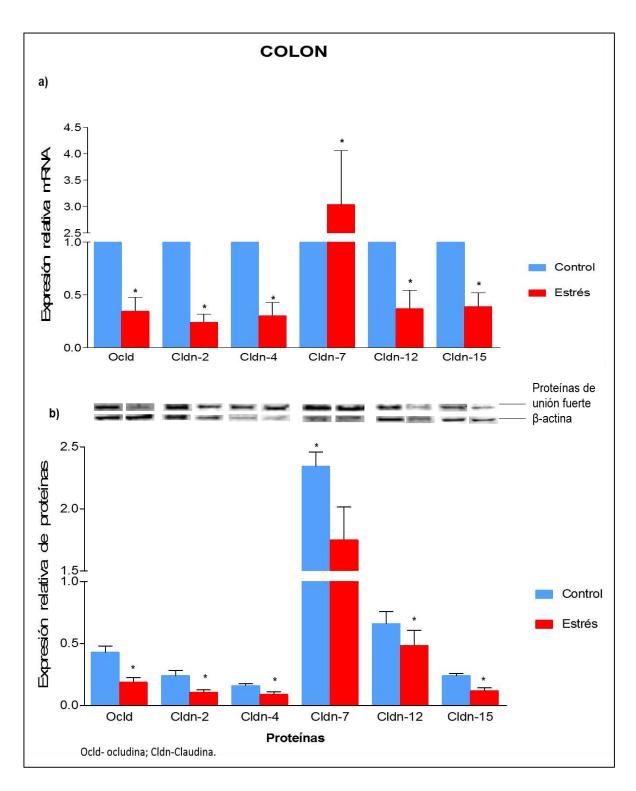


**Figura 10.** Efecto del estrés sobre la expresión de proteínas de unión fuerte en el íleon de dos experimentos independientes (n=6). a) Expresión génica (media ± EE); b) Expresión de proteínas (media ± DE).

# 8.2.3. Expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en el colon

En la **Figura 11**, se presentan los datos de la expresión génica y proteica ocludina y claudinas en el colon. Para la determinación de la expresión proteica de ocludina, claudina-2, -4, -7, -12 y -15, se consideró la densidad de las bandas con un PM de 65, 25, 22, 23, 27 y 24 kDa, respectivamente. Mientras que para actina, se consideró la densidad de banda de 43 kDa.

En el colon, se puede ver que en comparación con el control, el estrés disminuyó la expresión génica de la ocludina, claudina-2, claudina-4, claudina-12 y claudina-15 (P=0.001), mientras que aumentó la expresión de la claudina-7 (P=0.005). A nivel proteico, el estrés disminuyó significativamente la expresión de todas las proteínas analizadas (P<0.05) excepto la expresión de claudina-12 (P=0.277).



**Figura 11.** Efecto del estrés sobre la expresión de proteínas de unión fuerte en el colon de dos experimentos independientes (n=6). a) Expresión génica (media ± EE); b) Expresión de proteínas (media ± DE).

## 9. DISCUSIÓN

El presente estudio realizado en ratones hembras BALB/c como modelo experimental, permitió observar el efecto del estrés crónico sobre la expresión génica y proteica de la ocludina, claudina-2, claudina-4, claudina-7, claudina-12 y claudina-15 en el duodeno, íleon y colon de ratones bajo condiciones estresantes. Estas proteínas de unión fuerte tienen relevancia clínica porque están implicadas en la regulación de la permeabilidad paracelular del epitelio intestinal ya que cada proteína de unión fuerte presenta una función, como barrera o formadoras de poro para el transporte de iones y nutrientes. Por tanto, una desregulación en la expresión de dichas proteínas puede conducir a un aumento o disminución de la permeabilidad intestinal, lo cual puede desencadenar en una gran diversidad de enfermedades gastrointestinales como reflujo gastroesofágico, úlcera péptica, colitis, enfermedad de Crohn, IBS e incluso están involucradas en el desarrollo de cáncer en diferentes tejidos.

Los resultados mostraron que el estrés modificó diferencialmente la expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte en cada región intestinal. Con ciertas excepciones, no se observó una estricta correspondencia entre la expresión génica y proteica. En los casos en los que la expresión proteica fue más baja en relación a la expresión génica podría ser resultado de i) mecanismos de regulación transcripcional o traduccional de las proteínas que gobiernan en cada región intestinal en condiciones de estrés y/o ii) degradación proteolítica por enzimas de la región luminal de cada región intestinal.

En respuesta a nuestra primera pregunta de estudio, los resultados mostraron que el estrés intenso y repetido, altera la expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte evaluadas. A nivel de duodeno, se observó una fuerte respuesta al estrés en todos los genes pero a nivel proteico, se observó un efecto dual según la proteína evaluada, aumentando la expresión de claudina-2 y -12 y disminuyendo la expresión de claudina-7 y -15, dando como resultado un aumento en la permeabilidad intestinal. En relación a la ocludina, no se observaron cambios inducidos por el estrés crónico lo cual también ha sido observado en otros modelos

de estrés agudo en duodeno de rata (Lee et al., 2013). En el íleon y el colon, se observó un efecto contrario a lo mostrado en el duodeno en los ratones estresados, con una disminución en la expresión génica tanto de la ocludina como las claudinas-2, -4,-12 y -15. Sólo la claudina-7 aumentó su expresión tanto génica como proteica en ambos segmentos intestinales. A nivel proteico, en el íleon sólo se observó una tendencia negativa en la mayoría de las proteínas sin cambios significativos, lo cual podría ser una forma de regulación ante los cambios de permeabilidad causados en el duodeno. A excepción de las claudinas-2 y -12, las cuales sí presentaron cambios significativos. En el colón, la ocludina y la claudina-2, -4, -12 y -15 disminuyó su expresión proteica, dando como resultado una alteración estructural y aumento de la permeabilidad. Estos resultados fueron observados por Mazzon y colaboradores (2008) donde se describe también un aumento de la permeabilidad intestinal.

Estos resultados también, permiten observar que el estrés psicológico induce una respuesta selectiva según el segmento intestinal.

Bajo el mismo contexto, las uniones fuertes o estrechas presentan diferentes perfiles de expresión a lo largo del tracto gastrointestinal de acuerdo a sus requerimientos funcionales (Lu et al., 2013). Los resultados de este estudio podría reflejar la participación de componentes endocrinos del estrés y de factores inmunitarios que interaccionan mutuamente para modular las vías enzimáticas involucradas en la expresión de las proteínas de unión fuerte (Martínez et al., 2012)

Uno de los factores neuroendocrinos involucrados en la modulación de las proteínas de unión en condiciones de estrés es el CRF. Al someter al ratón al estímulo estresante, el cerebro percibe dicho estímulo desencadenando una respuesta fisiológica que involucra la liberación de CRF en regiones cerebrales e intestino y su unión con receptores distribuidos en el tracto intestinal (Bale y Vale, 2004). De hecho, la activación de CFR1 contribuye al aumento de la motilidad del colon, la defecación, la permeabilidad y la sensación de dolor visceral (Larauche et al, 2009), debido a que se encuentra distribuido principalmente en el colon y es fuertemente expresado en las células mucosas (O´Malley, 2010). Mientras que, la activación de

CRF2, prevalente en las regiones altas del tracto intestinal, inhibe el vaciado gástrico y suprime la función motora del colon (Dinan y Cryan, 2012).

El CRF induce la activación de mastocitos, los cuales liberan histamina, prostaglandinas, leucotrienos y proteasas como la Mcpt1 o bien inducen la activación de PAR. Lo anterior puede causar la degradación proteolítica de las proteínas de unión fuerte y por ello puede aumentar la permeabilidad paracelular permitiendo el paso de antígenos.

En relación a los componentes inmunitarios que modulan la expresión de proteínas de unión fuerte destacan las células T, células B y macrofágos que liberan citocinas proinflamatorias como TNF-α e IFN-γ. Estas citocinas pro-inflamatorias pueden alterar las vías de señalización intracelular que regulan la expresión de estas proteínas de unión fuerte (**Figura 5**).

Estudios previos realizados en roedores, muestran que bajo condiciones de estrés crónico existe un aumento en la expresión de TNF-α e IFN-γ. Dichas citocinas inducen la síntesis de MLCK. Esta enzima, promueve la polimerización de actina y miosina para desencadenar la endocitosis de las uniones fuertes favoreciendo el aumento en la permeabilidad intestinal (Capaldo, 2009). Lo anterior permite el aumento del flujo paracelular de moléculas de gran tamaño como antígenos bacteriano que son reconocidos por células del sistema inmune localizadas en la lámina propia del intestino. Estos antígenos son capaces de montar una respuesta inflamatoria y generar un círculo vicioso donde se perpetúa el efecto negativo del estrés sobre las proteínas de unión fuerte. Lo anterior da lugar a las manifestaciones clínicas como dolor abdominal y diarrea presentes en diferentes enfermedades inflamatorias como IBS (Martínez et al., 2012)

Aunque en este estudio no se evaluaron, las hormonas glucocorticoides de estrés como la corticosterona podrían estar implicadas en la expresión de las proteínas analizadas en este trabajo. Estudios en cultivos *in vitro* de células Caco-2 muestran que los glucocorticoides atenúan los efectos del TNF-α sobre el aumento de la permeabilidad tras formar un complejo con su receptor (GR). Este complejo GR

inhibió el aumento de MLCK inducido por el TNF-α debido a la unión del GR al GRE del DNA de la región promotora de MLCK (Boivin et al., 2007).

De acuerdo con Fujita y colaboradores (2006), la expresión de mRNA de claudina-2, en condiciones fisiológicas, se detecta fuertemente en el duodeno e íleon excepto en el colon. En el presente estudió bajo condiciones de estrés, se observó que en el duodeno hay sobreexpresión génica significativa, la cual se relaciona con su expresión proteica. En parte es debido a que esta proteína permite el paso de iones de Na<sup>+</sup> hacia el interior con la consecuente absorción de agua para mantener el equilibrio en la absorción de líquidos y electrólitos. También, podría deberse a la presencia de CFR inducido por estrés, el cual modula la producción de citocinas como TNF-α e IL-6 que en pacientes con IBD se ha encontrado en altos niveles. Dichas citocinas activan la vía MERK/ERK y PI3K/Akt lo que permite el incrementó de los niveles de expresión del factor de transcripción Cdx2 que promueve la síntesis de claudina-2. Sin embargo, niveles elevados de esta claudina son acompañados por una baja regulación y relocalización de proteínas de sellado como claudina-4, claudina-7 y ocludina, así como rápida velocidad de apoptosis y lesiones en el epitelio (Luetting et al, 2015). Lo anterior podría explicar porque en el duodeno observamos disminución en la expresión proteica de claudina-7 y ausencia de expresión de claudina-4. No obstante, la expresión génica y proteica de claudina-2 en íleon y colon disminuye en condiciones estresantes. Además, en el colon se presenta un epitelio impermeable donde hay mayor presencia de claudinas de sellado como claudina-4 ya que el tamaño de poro entre las células disminuye a través del tracto gastrointestinal.

En el caso de claudina-4, es una proteína que permite el sellado celular y disminuye la permeabilidad a cationes como el Na<sup>+</sup>, lo cual explicaría porque no se observó esta proteína en el duodeno ya que su expresión fue afectada por la presencia de claudina-2, también, se puede deber a que TNF-α e IFN-γ inducen la internalización de esta proteína. Respecto a la disminución en la expresión génica en el íleon y colon se debe a que su expresión puede ser regulada por el factor de transcripción SP1 ya que Ikari y colaboradores (2009) observaron que en células MDCK, EGF

activa la vía MEK/ERK e incrementa la expresión de SP1 lo que resulta en la elevación en la expresión de claudina-4, por lo tanto al disminuir la expresión de SP1, disminuye la expresión de claudina-4. A nivel proteína, la fosforilación es importante, por ejemplo, claudina-4 forma un complejo con el receptor EphA2 que fosforila en dominio citoplásmatico carboxilo-terminal, inhibiendo la asociación con ZO-1, lo que disminuye la integración de esta proteína en el sitio de contacto célula-célula (Tanaka et al., 2005). La disminución en la expresión de esta proteína de unión fuerte provoca un aumento en la permeabilidad intestinal alterando el paso de iones. Inclusive esta tendencia en la expresión se ha observado en pacientes con enfermedad de Crohn.

En un estado normal, la expresión de claudina-7 es abundante en el duodeno, íleon y colon (Fujita et al., 2006). Sin embargo, al someter al ratón a un estímulo estresante, se observó un aumento en la expresión de mRNA en las tres regiones evaluadas. Este aumentó de expresión podría ser un mecanismo de prevención ante una alteración estructural en el epitelio intestinal, ya que Ding y colaboradores (2012), demostraron que la deleción de claudina-7 provoca la disrupción de la arquitectura intestinal con ulceraciones en la mucosa, descamación epitelial e inflamación. Sin embargo, la expresión de proteínas no coincide con la expresión génica ya que esta disminuye. En el duodeno se puede atribuir al alto contenido de enzimas proteóliticas presentes en esta región, además de que la proteína es rica enresiduos de serina en el carboxilo terminal que puede sufrir fosforilación. En el íleon, la expresión proteica no cambia con respecto al control, podría ser una forma de regulación estructural para mantener el equilibrio osmótico entre Na+ y Cl-. En el colon, la disminución de la expresión de proteína puede deberse a que se requiere entrada de Na+ para una mayor absorción de agua.

En cuanto a la expresión de claudina-12, tanto la expresión génica como proteica en condiciones normales es fuerte en el íleon y débilmente en el colon, mientras que en el duodeno no se observa (Fujita et al., 2006). No obstante, bajo condiciones de estrés, se observó una sobreexpresión de esta claudina en el duodeno a nivel de mRNA y proteína. Además, dicha expresión disminuye de forma descendente en

el íleon y colon. A pesar de que su función es ambigua, está involucrada en la vía de señalización de la vitamina D y absorción de Ca<sup>2+</sup>, por lo que, al disminuir este ion, puede desencadenar el desmontaje de uniones fuertes causando endocitosis vía clatrina (Yu y Turner, 2008), además dicho ion es requerido para la formación de uniones intracelulares con E-caderina y el anillo actino-miosina, lo cual explicaría porque el nivel de expresión de proteínas en el íleon y colon disminuye.

Respecto a claudina-15, el estrés provocó una disminución gradual en la expresión de mRNA del duodeno al colon, lo cual se relaciona con la expresión sin condiciones de estrés en donde el gen de esta claudina se expresa fuertemente en el duodeno y disminuye en íleon y colon. Dicha expresión en el duodeno podría presentarse por la regulación del factor de transcripción HNF4α, el cual protege a la mucosa intestinal contra la inflamación de acuerdo con Babeu y Boudreau (2014). Además, al haber pérdida del mismo factor podría disminuir la expresión de claudina-15, lo que llevaría al desarrollo de mega intestino. Aunque, la expresión de proteínas es diferente, es decir, en el duodeno y colon disminuye, mientras que el íleon no hay cambios significativos.

#### 10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio realizado en ratones hembras BALB/c como modelo experimental, permite concluir:

- El modelo de estrés por inmovilización permitió observar que el estrés crónico de tipo psicológico, afecta la expresión génica y proteica de las proteínas de unión fuerte.
- El estrés modificó la expresión tanto de mRNA como de la proteína de ocludina, claudina-2,claudina-4,claudina-7,claudina-12 y claudina-15 en el duodeno, íleon y colon en ratones hembra BALB/c.
- El estrés crónico de tipo psicológico altera la expresión de proteínas de unión fuerte de forma diferencial en cada segmento intestinal.
- Estos resultados son de gran relevancia ya que permiten entender como el estrés crónico modifica la expresión de las proteínas de unión fuerte involucradas en la integridad de la barrera intestinal, lo cual favorece el paso de macromoléculas que inducen una respuesta inflamatoria implicada el desarrollo de enfermedades gastrointestinales.
- Otra conclusión es el impacto del estrés en el estilo de vida y la alimentación actual.

Estos resultados permiten entender como el estrés modifica la integridad de la barrera intestinal, favoreciendo la aparición de enfermedades como IBS, IBD, etc.; siendo estos padecimientos los que impactan la calidad de vida de los individuos que la padecen y pueden tener implicaciones en el desarrollo laboral, social y emocional de los mismos. Así mismo, el estrés tiene un profundo impacto en la alimentación actual ya que puede condicionar y favorecer una conducta alimenticia inadecuada regida por el estado emocional y por la falta de tiempo, llevando a consumir grandes o mínimas ingestas de alimentos no saludables con alto contenido calórico y baja calidad nutricional (comida chatarra), lo cual incide en la salud del individuo, provocando pérdida o ganancia de apetito desencadenando sobrepeso u obesidad, así como otros padecimientos. Por ello, es importante tener una

dieta completa y equilibrada, así como destinar el tiempo necesario para el consumo de alimentos (Barattucci, 2011).

# 11. PERSPECTIVAS

Este estudio podría contribuir al desarrollo de estrategias inmunológicas y farmacológicas para la prevención y/o control de la inflamación en enfermedades

intestinales asociadas al estrés psicológico ya que estas proteínas de unión fuerte podrían usarse como blancos terapéuticos en la industria farmacéutica.

También se propone el estudio de otros factores implicados en la respuesta fisiológica al estrés, como son:

- Analizar la concentración de ACTH y catecolaminas, las cuales están involucradas en la respuesta al estrés.
- Evaluar la expresión de CRF y hormonas sexuales en el intestino bajo condiciones estresantes.
- Evaluar la expresión delos diferentes factores de transcripción involucrados en la regulación de las proteínas de unión fuerte, así como citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-17, TNF-α e IFN-γ en el intestino en un modelo de estrés.
- Realizar ensayos de permeabilidad del epitelio intestinal con sácaridos y medir TER.
- Evaluar la microbiota intestinal de ratones BALB/c sometidos a estrés.
- Evaluar la respuesta del estrés durante la administración de probióticos como Bifidobacterium longum, el cual ya se encuentra en el mercado bajo el nombre Zir Fos® y es prescrito a pacientes con IBS.
- Evaluar la respuesta de compuestos naturales como la berberina y el ácido ferúlico bajo condiciones estresantes.
- Evaluar la expresión de proteínas de unión fuerte en intestino de ratones macho sometido a estrés crónico.

#### 12. REFERENCIAS

Al-Sadi, R., K. Khatib, S. Guo, D. Ye, M. Youssef and T. Ma (2011). "Occludin

- regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300(6): G1054-1064.
- Amasheh, S., M. Fromm and D. Gunzel (2011). "Claudins of intestine and nephron a correlation of molecular tight junction structure and barrier function." Acta Physiol (Oxf) 201(1): 133-140.
- Amasheh, S., N. Meiri, A. H. Gitter, T. Schoneberg, J. Mankertz, J. D. Schulzke and M. Fromm (2002). "Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells." J Cell Sci 115(Pt 24): 4969-4976.
- Anderson, J. M. and C. M. Van Itallie (1995). "Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability." Am J Physiol 269(4 Pt 1): G467-475.
- Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S (1996). Interspecies diversity of the occluding sequence cDNA cloning of human, mouse, dog and rat-kangaroo homologues. J. Cell Biol. 133: 43.47.
- Arrieta, M. C., L. Bistritz and J. B. Meddings (2006). "Alterations in intestinal permeability." Gut 55(10): 1512-1520.
- Babeu, J. P., Boudreau, F. (2014). Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. World J Gastroenterol. 20 (1): 22-30.
- Bal, M. S., V. Castro, J. Piont1ek, C. Rueckert, J. K. Walter, A. Shymanets, B. Kurig, H. Haase, B. Nürnberg and I. E. Blasig (2012). "The hinge region of the scaffolding protein of cell contacts, zonula occludens protein 1, regulates interacting with various signaling proteins." Journal of Cellular Biochemistry 113(3): 934-945.
- Bale, T. L. and W. W. Vale (2004). "CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors." Annu Rev Pharmacol Toxicol 44: 525-557.
- Barattucci, Y. (2011). Estrés y alimentación. Licenciatura en Nutrición. Universidad Fasta. Facultad de Ciencias Médicas. Págs. 27-33.
- Barmeyer, C., J. D. Schulzke and M. Fromm (2015). "Claudin-related intestinal diseases." Semin Cell Dev Biol 42: 30-38.

- Bertiaux-Vandaele, N., S. B. Youmba, L. Belmonte, S. Lecleire, M. Antonietti, G. Gourcerol, A. M. Leroi, P. Dechelotte, J. F. Menard, P. Ducrotte and M. Coeffier (2011). "The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype." Am J Gastroenterol 106(12): 2165-2173.
- Bhatia N., Maiti P. P., Choudhary A., Tuli A., Masih D., Masih M., Khan U., Ara T., Jaggi S. A. (2011). Animal models in the study of stress: A review. NSHM Journal of pharmacy and Healthcare Management. (2): 42-50.
- Blasig, I. E., C. Bellmann, J. Cording, G. Del Vecchio, D. Zwanziger, O. Huber and R. F. Haseloff (2011). "Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions." Antioxid Redox Signal 15(5): 1195-1219.
- Blikslager A. T., Moeser A. J., Gookin J. L., Podele J. (2007). Restoration of barrier functional in injured intestinal mucosa. Physiol Rev. 87.
- Boirivant M., Strober W. (2007). The mechanism of action of probiotics. Curr Opin Gastroenterol. 23:679-692.
- Boivin, M. A., D. Ye, J. C. Kennedy, R. Al-Sadi, C. Shepela and T. Y. Ma (2007). "Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292(2): G590-598.
- Bücker, R., M. Schumann, S. Amasheh and J.-D. Schulzke (2010). "Claudins in Intestinal Function and Disease." 65: 195-227.
- Buynitsky, T. and D. I. Mostofsky (2009). "Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments." Neurosci Biobehav Rev 33(7): 1089-1098.
- Capaldo, C. T. and A. Nusrat (2009). "Cytokine regulation of tight junctions." Biochim Biophys Acta 1788(4): 864-871.
- Carrasco, G. A. and L. D. Van de Kar (2003). "Neuroendocrine pharmacology of stress." European Journal of Pharmacology 463(1-3): 235-272.
- Colegio, O. R., C. M. Van Itallie, H. J. McCrea, C. Rahner and J. M. Anderson (2002). "Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells." Am J Physiol Cell Physiol 283(1): C142-147.
- Colligan, T. W. and E. M. Higgins (2006). "Workplace Stress." Journal of Workplace

- Behavioral Health 21(2): 89-97.
- Collins, S. M. (2001). "Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance."

  Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(3): G315-318.
- Cryan, J. F. and T. G. Dinan (2012). "Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour." Nat Rev Neurosci 13(10): 701-712.
- Dhawan, P., R. Ahmad, R. Chaturvedi, J. J. Smith, R. Midha, M. K. Mittal, M. Krishnan, X. Chen, S. Eschrich, T. J. Yeatman, R. C. Harris, M. K. Washington, K. T. Wilson, R. D. Beauchamp and A. B. Singh (2011). "Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation." Oncogene 30(29): 3234-3247.
- Demaude, J., C. Salvador-Cartier, J. Fioramonti, L. Ferrier and L. Bueno (2006). "Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction." Gut 55(5): 655-661.
- Dhabhar, F. S. (2009). "Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology." Neuroimmunomodulation 16(5): 300-317.
- Dhabhar, F. S. and B. S. McEwen (1997). "Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking." Brain Behav Immun 11(4): 286-306.
- Dinan, T. G. and J. F. Cryan (2012). "Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology." Psychoneuroendocrinology 37(9): 1369-1378.
- Ding L., Lu Z., Foreman O., Tatum R., Lu Q., Renegar R., Cao J., Chen Yan-Hua. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7 deficient mice. Gastroenterology. 142: 305-315.
- Elkouby-Naor, L. and T. Ben-Yosef (2010). "Functions of Claudin Tight Junction Proteins and Their Complex Interactions in Various Physiological Systems."

- 279: 1-32.
- Farhadi, A., J. Z. Fields and A. Keshavarzian (2007). "Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: stress, intestinal hyperpermeability and inflammation." World J Gastroenterol 13(22): 3027-3030.
- Farquher M. G. and Palade G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol. 17: 375-412.
- Feldman, G. J., J. M. Mullin and M. P. Ryan (2005). "Occludin: structure, function and regulation." Adv Drug Deliv Rev 57(6): 883-917.
- Ferrier, L., L. Mazelin, N. Cenac, P. Desreumaux, A. Janin, D. Emilie, J.-F. Colombel, R. Garcia-Villar, J. Fioramonti and L. Bueno (2003). "Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-γ and myosin light chain kinase in mice." Gastroenterology 125(3): 795-804.
- Ferrufino J. C., Taxa L., Angeles G. (1996). Histología normal del intestino delgado. Rev Med Hered. (7): 46-57.
- Förster, C. (2008). "Tight junctions and the modulation of barrier function in disease." Histochem Cell Biol 130(1): 55-70.
- Forsythe, P. (2013). "Gut microbes as modulators of the neuro-immuno-endocrine system." PharmaNutrition 1(4): 115-122.
- Fujita, H., H. Chiba, H. Yokozaki, N. Sakai, K. Sugimoto, T. Wada, T. Kojima, T. Yamashita and N. Sawada (2006). "Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine." J Histochem Cytochem 54(8): 933-944.
- Gal I. B., López G. M., Martín V. A., Prieto M. J. (2007). Bases de la fisiología. 2a edición. Ed. Tebar. Pp. 297-304.
- Gambarana C., Ghiglieri O., Taddei I., Tagliamonte A., De Montis M. G. (1995). Imipramine and fluoxetin prevent the stress induced escape déficits in rats through a distinct mechanism of action. Behav Pharmacol. 6(1): 66-73.
- Glaser, R. and J. K. Kiecolt-Glaser (2005). "Stress-induced immune dysfunction: implications for health." Nat Rev Immunol 5(3): 243-251.
- Goldstein D. and McEwen B. (2002). Allostasis, Homeostats, and the Nature of

- Stress. 5(1): 55-58.
- González-Mariscal, L., R. Tapia and D. Chamorro (2008). "Crosstalk of tight junction components with signaling pathways." Biochim Biophys Acta 1778(3): 729-756.
- Grenham, S., G. Clarke, J. F. Cryan and T. G. Dinan (2011). "Brain-gut-microbe communication in health and disease." Front Physiol 2: 94.
- Groschwitz, K. R. and S. P. Hogan (2009). "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." J Allergy Clin Immunol 124(1): 3-20; quiz 21-22.
- Gumbiner, M. G. (1993). Breaking through the tight junction barrier. Journal of Cell Biology. 123 (6): 1631-1633.
- Günzel, D. and A. S. Yu (2013). "Claudins and the modulation of tight junction permeability." Physiol Rev 93(2): 525-569.
- Harhaj, N. S. and D. A. Antonetti (2004). "Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology." Int J Biochem Cell Biol 36(7): 1206-1237.
- He, S., F. Liu, L. Xu, P. Yin, D. Li, C. Mei, L. Jiang, Y. Ma and J. Xu (2016).
  "Protective Effects of Ferulic Acid against Heat Stress-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction *In Vitro* and *In Vivo*." PLoS One 11(2): e0145236.
- Heiskala, M., P. A. Peterson and Y. Yang (2001). "The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport." Traffic 2(2): 93-98.
- Hewitt, K. J., R. Agarwal and P. J. Morin (2006). "The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues." BMC Cancer 6: 186.
- Holmes J. L., Van Itallie C. M., Rasmussen J. E., Anderson J. M. (2006). Claudina profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract revels complex expression patterns. Gene Expr Patterns. 6: 581-588.
- Hwang, I., B. S. An, H. Yang, H. S. Kang, E. M. Jung and E. B. Jeung (2013). "Tissue-specific expression of occludin, zona occludens-1, and junction adhesion molecule A in the duodenum, ileum, colon, kidney, liver, lung, brain, and skeletal muscle of C57BL mice." J Physiol Pharmacol 64(1): 11-18.

- Ikari A., Atomi K., Takiguchi A., Yamazaki Y., Masao M., Sugatani J. (2009). Epidermal Growth Factor increases claudin-4 expression mediated by SP1 elevation in MDCK cells. Biochemical and Biophysical Research Comminications. 384: 306-310.
- Jaggi, A. S., N. Bhatia, N. Kumar, N. Singh, P. Anand and R. Dhawan (2011). "A review on animal models for screening potential anti-stress agents." Neurol Sci 32(6): 993-1005.
- Jiménez M. T., García G. A., Dominguez H. L., Contreras M. C. (2008). Estrés psicosocial: Algunos aspectos clínicos y experimentales. Anales de Psicología. 24(2): 353-360.
- Johnson E.O., Kamilaris T. C., Chrousos G. P., Gold P. W. (1992). Mechanism of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neuroscience and Biobehavioral Reviews.16: 115:130.
- Kagias K., C. Nehammer and R. Pocock (2012). "Neuronal responses to physiological stress." Front Genet 3: 222.
- Karczewski J., Troost F. J., Konings I., Dekker J., Kleerebezem M., Brummer R.J., Wells J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 298: G851-G859.
- Kiliaan, A. J., P. R. Saunders, P. B. Bijlsma, M. C. Berin, J. A. Taminiau, J. A. Groot and M. H. Perdue (1998). "Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum." Am J Physiol 275(5 Pt 1): G1037-1044.
- Konturek, P. C., T. Brzozowski and S. J. Konturek (2011). "Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options." J Physiol Pharmacol 62(6): 591-599.
- Krause, G., L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek and I. E. Blasig (2008). "Structure and function of claudins." Biochim Biophys Acta 1778(3): 631-645.
- Kupriyanov R. and Zhdanov R. (2014). The eustress concept: Problems and outlooks. World journal of medical sciences. 11(2): 179-185.
- Kyoko, O. O., H. Kono, K. Ishimaru, K. Miyake, T. Kubota, H. Ogawa, K. Okumura,

- S. Shibata and A. Nakao (2014). "Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis." PLoS One 9(5): e98016.
- Lambert, G. P. (2009). "Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects." J Anim Sci 87(14 Suppl): E101-108.
- Lameris A. I., Hubeys S., Kaukinen K., Mäkelä T. H., Bindels R. J., Hoenderop J. G., et al. (2013). Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 48:58-69.
- Larauche, M., C. Kiank and Y. Tache (2009). "Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications."

  J Physiol Pharmacol 60 Suppl 7: 33-46.
- Lee, H. S., D. K. Kim, Y. B. Kim and K. J. Lee (2013). "Effect of acute stress on immune cell counts and the expression of tight junction proteins in the duodenal mucosa of rats." Gut Liver 7(2): 190-196.
- Lei Z., Maeda T., Tamura A., Nakamra T., Yamazaki Y., Shiratori H., et al (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. Dev Biol. 371: 136-145.
- Liu, X., G. Yang, X. R. Geng, Y. Cao, N. Li, L. Ma, S. Chen, P. C. Yang and Z. Liu (2013). "Microbial products induce claudin-2 to compromise gut epithelial barrier function." PLoS One 8(8): e68547.
- Lu, Z., L. Ding, Q. Lu and Y. H. Chen (2013). "Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases." Tissue Barriers 1(3): e24978.
- Luettig, J., R. Rosenthal, C. Barmeyer and J. D. Schulzke (2015). "Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation." Tissue Barriers 3(1-2): e977176.
- Martínez C., González-Castro A., Vicario M., Santos J. (2012). Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. Gut Liver. 6(3):305-15.
- Mazzon, E. and S. Cuzzocrea (2008). "Role of TNF-alpha in ileum tight junction

- alteration in mouse model of restraint stress." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294(5): G1268-1280.
- McEwen, B. S. (2005). "Stressed or stressed out: what is the difference?" J Psychiatry Neurosci 30(5): 315-318.
- Meddings, J. B. and M. G. Swain (2000). "Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat." Gastroenterology 119(4): 1019-1028.
- Moscoso M. S. (1998). Estrés salud y emociones: estudio de la ansiedad, cólera y hostilidad. Revista de Psicología. 3: 9-17.
- O'Mahoney S. M., Hyland N.P., Dinan T.G., Cryan J.F. (2011). Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. Psychopharmacology (Berl.). 214: 71-88.
- O'Malley D., Julio-Piper M., Gibney S. M., Gosselin R. D., Dinan T. G., Cryan J. F. (2010). Differential stress-induced alterations of colonic corticotropin releasing factor receeptors in the Wistar Kyoto rat. Neurogastroenterolol Motil. 22(3): 301-311.
- Pérez T. E., Francis AJ. M., Sahagún B. F., Stalnikowitz K. D. Gastroenterología. 1a Edición. McGrawHill. México. 2012. Pp. 199-210.
- Prasad S., Mingrino R., Kaukinen K., Hayes K.L., Powell R. M., MacDonald T. T., Collins J. E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epitelial cells. Lab Invest. 85: 1139-1162.
- Rahner, C., L. L. Mitic and J. M. Anderson (2001)."Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut."Gastroenterology 120(2): 411-422.
- Ramirez M. J. S. (2007). La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. REB. 26(4):121-128.
- Rhee, S. H., C. Pothoulakis and E. A. Mayer (2009). "Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis." Nat Rev Gastroenterol Hepatol 6(5): 306-314.
- Robinson, K., Z. Deng, Y. Hou and G. Zhang (2015). "Regulation of the Intestinal Barrier Function by Host Defense Peptides." Front Vet Sci 2: 57.

- Segarra E. E. Fisiología de los Aparatos y Sistemas. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas. Ecuador, 2006. Página 45.
- Selye, H. (1951). "The general-adaptation-syndrome and the diseases of adaptation." South Med Surg 113(10): 315-323.
- Singh, A. B., A. Sharma and P. Dhawan (2010). "Claudin family of proteins and cancer: an overview." J Oncol 2010: 541957.
- Smith, S. M. and W. W. Vale (2006). "The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress." Dialogues Clin Neurosci 8(4): 383-395.
- Söderholm, J. D. and M. H. Perdue (2001). "Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(1): G7-G13.
- Sterling P. and Eyer J. (1988). Allostasis: a new paradigm explains arousal pathology. In: Handbook of Life Stress, Cognition and Health. Fisher J, Reason j, Eds. New York: John Wiley & Sons Inc. PP 629-649.
- Sutanto, W. and E. R. de Kloet (1994). "The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena." Laboratory Animals 28(4): 293-306.
- Suzuki, T. (2013). "Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions." Cell Mol Life Sci 70(4): 631-659.
- Taché, Y. and M. H. Perdue (2004). "Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function." Neurogastroenterol Motil 16 Suppl 1: 137-142.
- Tamura, A., H. Hayashi, M. Imasato, Y. Yamazaki, A. Hagiwara, M. Wada, T. Noda, M. Watanabe, Y. Suzuki and S. Tsukita (2011). "Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na+ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine." Gastroenterology 140(3): 913-923.
- Tamura A., Y. Kitano, M. Hata (2008). Megaintestine in claudin-15 deficient mice. Gastroenterology.134: 523-534.
- Tanaka M., Kamata R. and Sakai R. (2005). EphA2 Phosphorylates the Cytoplasmic Tail of Claudin-4 and Mediates Paracellular Permeability. The Journal of Biol

- Chemistry. 2 80 (51): 42375-42382.
- Tsukita, S. and M. Furuse (1999). "Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?" Trends Cell Biol 9(7): 268-273.
- Trujillo, J. O. R., N. F. Márquez, R. C. Bustamante, J. F. C. León, E. M. Barrios, F. Z. Mondragón, J. M. C. Méndez and J. R. Mayans (2012). "Sistema Nervioso Entérico y Motilidad Gastrointestinal. Acta Pediátrica México. **33**(4): 207-214.
- Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." Nat Rev Immunol 9(11): 799-809.
- Ulluwishewa, D., R. C. Anderson, W. C. McNabb, P. J. Moughan, J. M. Wells and N.C. Roy (2011). "Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components." J Nutr 141(5): 769-776.
- Van de Kar LD, Blair ML (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. Front. Neuroendocrinol. 20: 1 48.
- Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (2006). "Claudins and epithelial paracellular transport." Annu Rev Physiol 68: 403-429.
- Von Borell EH (2001). The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. Journal of Animal Science. 79: E260- E267.
- Webster I. J., Tonelli L., Sternberg M. E. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. Annual review of Immunology. 20: 125-163.
- Yu D. and Turner R. Jerrold. (2008). Stimulus- induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. Biochim Biophys Acta. 1778 (3): 709-716.
- Zendejas Z. V. E. and Huerta R. E. P. (2010). Importancia de las uniones estrechas en los epitelios: El papel de las claudinas. Mensaje bioquímico. XXXIV. 1-15.
- Zareie M., Johnson -Henry K., Jury J., Yang P.C., Ngan B.Y., McKay D. M., Soderholm J. D., Perdue M. H., Sherman P. M. (2006). Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. Gut. 55:1553-1560.
- Páginas de internet:www.saluduncional.wordpress.com

### **ANEXOS**

### Anexo 1. Carta de aceptación del Bioterio



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA Unidad Xochimilco División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UPEAL · bioterio

DCBS. CICUAL.027.14

10 de Abril del 2014.

DRA. MARIA ELISA DRAGO SERRANO DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS Presente

Por este conducto se le informa que de acuerdo con el "Manual de Organización y Procedimientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio".

El CICUAL-UAM-X en su reunión del día 10 de abril del presente año decidió APROBAR, su protocolo de INVESTIGACIÓN No. 121/2014 titulado:

"Evaluación del efecto del estrés intenso repetido sobre algunos parámetros relacionados con la homeostásis intestinal en ratones Balb/c"

Este protocolo tendrá una vigencia de 3 años a partir de la fecha.

Atentamente

M. en C. Rosario C. Vargas Solís Representante del Departamento

Rawer C. Vage

Dra. Yvonne M. Heuze de Icaza Coordinadora de la UPEAL-Bioterio

Secretaria

Dr. Miguel Angel Zavala Sánchez Representante del Departamento

Sistemas Biológicos

MVZ. E. Heriberto Quintana Flores Jefe de Proyecto de la UPEAL-Bioterio M. en C. Aejandro Palma Ramos Representante del Departamento Sistemas Biológicos

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez Representante del Departamento Atención a la Salue

MVZ Luis Pedro Moles y Cervantes Representante del Departamento Producción Agrícola y Animal



Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, México 04960, D.F. Tel. 5483-7195 Fax: 5483-7585 e-mail: ymheuze@correo.xoc.uam.mx

### Anexo2. Resúmenes y cartas de participación de eventos científicos



### Bioquímica Clínica y Diagnóstico Molecular



### CARTEL - BDM00002

Efecto del estrés sobre la expresión de ocludina en diferentes regiones intestinales de ratones BALB/c

Machorro-Rojas Nancy<sup>1</sup>, Castañeda-Sánchez Jorge Ismael<sup>2</sup>, Sáinz-Espuñes Teresita<sup>2</sup>, Godínez-Victoria Marycarmen<sup>3</sup>, Campos-Rodríguez Rafael<sup>4</sup>, Drago-Serrano Maria Elisa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Maestría C.Farmaéuticas UAM-Xochimilco

<sup>2</sup>Depto. Sist. Biol. UAM-Xochimilco

<sup>3</sup>Secc. Est Posgr e Invest Esc. Sup. Med. IPN

<sup>4</sup>Secc. Est.Posgr. e Invest. Esc. Sup. Med. IPN

<sup>5</sup>Depto. Sist. Biol UAM-Xochimilco

Introducción: El estrés es una señal de alarma que evoca la respuesta de factores neuroendocrinos liberados tras la activación de inervaciones del eje cerebro-intestino y del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal que pueden afectar la expresión proteínas transmembranales de unión fuerte involucradas en la regulación de la permeabilidad del epitelio intestinal como la ocludina.

Objetivo: Analizar el efecto del estrés sobre la expresión de la ocludina en distintas regiones del tracto intestinal.

Metodología: Un grupo de 6 ratones BALB/c hembras de 8 semanas estresado por inmovilización 2 hr por 4 días y otro grupo control sin estrés fueron sacrificados con isoflurano y sangrados por punción cardiaca antes de disectar el tracto intestinal. El intestino se lavó con solución salina y se dividió en duodeno, íleon y colon; de cada región se obtuvo mucosa para la extracción de RNA total, posteriormente se realizó RT-QPCR para evaluar la expresión de ocludina. Los datos fueron normalizados respecto al gen constitutivo β-actina y la expresión relativa fue calculada por el método 2- $\Delta\Delta$ Ct, usando el grupo control como calibrador del experimento. Los resultados de cada grupo fueron comparados con la prueba T de Student.

Resultados: En comparación con los ratones control, en los ratones estresados la expresión relativa de ocludina en el colon fue significativamente menor (p<0.05) y no se encontraron diferencias en el duodeno e íleon. El efecto del estrés sobre la reducción del ARNm de ocludina en el colon podría estar asociado con apoptosis causada por el factor de necrosis tumoral alfa inducido por neurotransmisores y/o neuropéptidos liberados por fibras nerviosas del eje cerebro-intestino diferencialmente distribuidas en el tracto intestinal.

Conclusiones: La reducción de la expresión de ocludina en el colon por el estrés podría alterar la permeabilidad intestinal y favorecer inflamación asociada a disfunciones como la colitis. El estudio del efecto del estrés sobre la expresión de ocludina en las diferentes regiones intestinales podría contribuir a la comprensión de factores emocionales implicados en la inflamación intestinal y al desarrollo de estrategias farmacológicas para su prevención y/o control. Agradecimiento de Nancy Machorro Rojas al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 326989.





# La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. otorga el presente

# RECONOCIMIENTO a:

Castañeda-Sánchez, Teresita Sáinz-Espuñes, Marycarmen Godínez-Victoria, Nancy Machorro-Rojas, Maria Elisa Drago-Serrano, Jorge Ismael Rafael Campos-Rodríguez

Por la presentación del Trabajo Libre

Efecto del estrés sobre la expresión de ocludina en diferentes regiones intestinales de ratones BALB/c

durante XLVIII Congreso Naci<mark>onal</mark> de Ciencias Farmacéuticas y VI Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas Cancún Quintana Roo - 6 al 9 de septiembre 2015

Dra. Dea Herrera Ruiz Presidencia

Q.F.B. Gabriela Meza Suárez

Q.r.b. Gabriela Meza Suarez Dirección de Ciencia y Tecnología





### Effect of stress on the intestinal expression of claudin-2 in BALB/c mice

<sup>1</sup>Machorro-Rojas Nancy, <sup>2</sup>Sainz-Espuñes Teresita, <sup>2</sup>Castañeda-Sánchez Jorge Ismael, <sup>3</sup>Godínez-Victoria Marycarmen, <sup>3</sup>Campos-Rodríguez Rafael, <sup>3</sup> Cruz-Hernández Teresita Rocío, <sup>2</sup>Drago-Serrano Maria Elisa (dragome@yahoo.com)

<sup>1</sup> Postgraduate Student, MsC Programm of Pharmaceutical Sciences, Metropolitan Autonomous University Xochimilco (UAM-X). <sup>2</sup> Department of Biological Systems UAM-X. <sup>3</sup> Postgraduate and Research Section, National Polytechnic Institute (IPN). Working place: Lab. of Molecular Microbiology, UAMX, Calz. del Hueso No. 1100 México DF 04960, Mexico, Tel +5255 54837000 ext 3624/3652

Introduction. Claudin-2 is a tight-binding transmembrane protein involved in the regulation of intestinal permeability that shows a differential pattern of distribution along the intestinal tract and whose normal expression can be altered by stress. Aim. To analyze the effect of stress on the expression of Claudin-2 in different regions of the intestinal tract. Methods. A group of female 6 BALB/c mice of 8 weeks stressed by board immobilization 2hr for 4 days and another unstressed control group were euthanized with isoflurane and ex-sanguinated by cardiac puncture. Intestinal tract was dissected and washed with saline and then samples duodenum, ileum and colon were collected. Luminal surface of each intestinal region was scraped with a glass slide to collect whole mucosa for the extraction of total RNA. Subsequently, RT-qPCR was performed to evaluate the mRNA expression of claudin-2. All data were normalized to the housekeeping gene β- actin and mRNA relative expression was calculated by the method 2-\(\textit{\Delta}\) using the control group for data calibration. Comparison of results between the two groups were analyzed by using Student's t test and the significant differences were regarded at P values <0.05. Results. By comparison with control mice, relative mRNA expression of claudin-2 in the stressed mice was significantly lower in the ileum (p <0.05) whereas no significant differences were found in duodenum and colon. Discussion. Decreased mRNA expression of claudin-2 in ileum may result by the stress response corticotropin releasing factor (CRF) with receptors differentially distributed in the epithelial cells of the intestinal tract. Claudin-2 decrease in the ileum may protect the gut integrity against pro-inflammatory interleukins (ILs) like IL-6 that increases the gut permeability by enhancing the claudin-2 expression. Perspectives. The study of the effect of stress on claudin-2 expression could contribute to the understanding of emotional factors involved in gut inflammation and on the development of immunological and pharmacological strategies for prevention or control.

### References

Söderholm JD et al. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001; 280:G7-G13. Lu Z et al. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. Tissue Barriers.

2013;1(3):e24978. doi: 10.4161/tisb.24978. Liu X et al Microbial products induce claudin-2 to compromise gut epithelial barrier function. PLoS One. 2013; 8(8):e68547. doi: 10.1371/journal.pone.0068547

Suzuki Tet al. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. J Biol Chem. 2011;286(36):31263-71. doi: 10.1074/jbc.M111.238147.



### Se Otorga la presenta

# CONSTANCIA

## Nancy Machorro Rojas

Quien asistió y presento el trabajo:

Effect of stress on the intestinal expression of claudin-2 in BALB/c mice

Por:

Machorro-Rojas Nancy, Sainz-Espuñes Teresita, Castañeda-Sánchez Jorge Ismael, Godínez-Victoria Marycarmen, Campos-Rodríguez Rafael, Cruz-Hernández Teresita Rocío, Drago-Serrano Maria Elisa

En la modalidad de cartel durante el IV Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias del 4 al 8 de octubre de 2015 en Metepec Atlixco, Puebla.

Atentamente El Comité Organizador

Stuam Brom Klanner

,

Lahniel Lucumm Dr. Gabriel Guarneros Peña

Dr. Luis Servin González

Dr. José Luis Puente García

Dr. Luis Servin

Dr. Miguel Castañeda Lucio





### Effect of stress on the expression of claudins in the ileum of BALB/c

Machorro-Rojas Nancy<sup>1</sup>, Godínez-Victoria Marycarmen <sup>2</sup>, Sainz-Espuñes Teresita <sup>3</sup>, Castañeda-Sánchez Jorge Ismael<sup>3</sup>, Campos-Rodríguez Rafael<sup>2</sup>, Drago-Serrano Maria Elisa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de la Maestria en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAMX). <sup>2</sup>Seccion de Estudios de Posgrado e Investigacion, Escuela Superior de Medicina (ESM), Instituto Politecnico Nacional (IPN). <sup>3</sup>Laboratorio de Microbiologia Molecular, Departamento de Sistemas Biologicos, UAMX. Lugar de trabajo: Laboratorio 2 del Departamento de Bioquímica de la ESM-IPN. Plan de San Luis esq. Salvador Díaz Mirón, México DF 11340, Mexico, Tel +5255 57296300 ext 62743.

Introduction. Stress is an alarm signal that evokes the release of neuroimmune factors that affects the expression of transmembrane proteins at the paracellular surface of the epithelial cell layer such as claudins (1,2). Alterations on claudin expression in ileum may contribute to the development of inflammation i.e. ileitis (3). Aim. To analyze the effect of stress on the expression of claudin-2, -4 and -7 in ileum of BALB / c mice. Methods. Group of 6 BALB/c female mice (8 weeks old) were stressed by immobilization for 2 h/day during 4 days and a mice group without stress was included as control. Mice were euthanized with isoflurane, distal small intestine (next to cecum) was dissected and rinsed with saline solution; the luminal surface was scraped with a glass slide for sampling whole mucosa to assess the relative protein expression or mRNA expression by Western blot and RT-QPCR, respectively. Data were normalized to β-actin housekeeping gene in both techniques. Results were compared with Student's t-test and the significant differences were regarded at P values <0.05. **Results.** By comparison with control mice, in stressed mice expression of claudin-2 was lower at protein and mRNA levels (P <0.05) but in the case of claudin-4 and -7 only at mRNA level. Discussion. Decreased expression of claudin-2 may result from the release of pro-inflammatory interleukins (IL) such as IL-6, which promote intestinal inflammation. Conclusion. Reduced expression of claudin-2 by stress may contribute alter permeability favoring inflammation associated with disorders such as ileitis **Perspectives.** The study of stress impact on claudins could contribute to the understanding of factors involved in inflammation in ileum and the development of immunological and pharmacological strategies for prevention and/or control.

Nancy Machorro Rojas agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 326989.

Ramírez MJS. La Neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. REB. 2007. 26(4): 121-128. Carrasco AG, Van de Kar DL. Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur J Pharm 2003. 463: 235-272. Boivin MA et al. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.2007. 292 (2): G590-G598.

Suzuki T et al. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. J Biol Chem. 2011;286(36):31263-71



Se otorga la presente

# CONSTANCIA

# Nancy Machorro Rojas

Quien asistió y presento el trabajo:

Effect of stress on the expression of claudins in the ileum of BALB/c

Castañeda-Sánchez Jorge Ismael, Campos-Rodríguez Rafael, Drago-Serrano Maria Elisa Machorro-Rojas Nancy, Godínez-Victoria Marycarmen, Sainz-Espuñes Teresita,

En la modalidad de cartel durante el I Congreso de Neurobiología del 2 al 6 de abril de 2016 en Puebla, Pue.

El Comité Organizador Atentamente

Lourdes Massieu Trigo

Clorinda Arias Álvarez

Milagros Méndez Ubach

Julio Morán Andrade Angélica Zepeda Rivera

### Simposio Internacional de Inmunonutrición Avanzada: Microbiota e Inmunidad Intestinal

### 23-25 de Mayo

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO









www.inmunologiaavanzadatolucamx.com

### 224/23. Effect of stress on expression of tight junction in colon from BALB/c mice

### Autores:

(1) Godínez-victoria, Marycarmen; (2) Machorro-rojas, Nancy; (3) Sainz-espuñes, Teresita; (4) Castañedasánchez, Jorge Ismael; (5) Pacheco-yepez, Judith Del Carmen; (4) Drago-serrano, Maria Elisa.

### Filiación:

(1) Médico. D en C en Inmunología. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. México.; (2) Estudiante de La Maestria en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Cdmx. México.; (3) D. en C. Laboratorio de Microbiologia Molecular. Departamento de Sistemas Biologicos. UAMX. CDMX. México.; (4) D en C. Laboratorio de Microbiologia Molecular. Departamento de Sistemas Biologicos. UAMX. CDMX. México.; (5) D. en C. Seccion de Estudios de Posgrado E Investigacion. Escuela Superior de Medicina Del Instituto Politecnico Nacional. Cdmx México.

### Resumen:

### Introducción

Several intestinal diseases such as inflammatory bowel disease, microscopic colitis, celiac disease, irritable bowel syndrome and gallstones are associated with altered levels of tight junction (TJ) proteins, bacterial infection and chronic stress. Changes in expression or molecular structure of occluding and claudins can generally result in (i) decreased absorptive passage, (ii) increased secretory passage of small solutes and water causing leak flux diarrhea and (iii) increased absorptive passage of macromolecules which may induce inflammatory processes.

### Objetivos

Evaluate the effect of repeated intense stress on expression of occluding and claudins in colon from mice.

### Método

A group of female 6 BALB/c mice of 8 weeks stressed by immobilization 2 h during 4 consecutive days and another unstressed control group were euthanized with isoflurane and bled by cardiac puncture before dissecting the intestinal tract. Colon (next to rectum) from each mouse was dissected and washed with saline and luminal surface was scraped with a glass slide to collect whole mucosa to evaluate the protein expression or relative mRNA expression of occluding and claudins by Western blot or real time RT-PCR, respectively. Comparison of results between the two groups were analyzed by using Student's t test and the significant differences were regarded at P values < 0.05.

### Resultados

By comparison with control mice, relative mRNA or protein expression of occluding, claudin-2 and claudina-4 significantly decreased in stressed mice. mRNA expression of Claudin-7 increased but protein expression decreased in stressed mice.

### Conclusiones

Decreased mRNA expression of TJ proteins may result by the stress response corticotropin releasing factor (CRF) and associated with apoptosis by TNF- $\alpha$  induced by interacting with receptors differentially distributed in the epithelial cells of the intestinal tract.

### Simposio Internacional de Inmunonutrición Avanzada: Microbiota e Inmunidad Intestinal

### 23-25 de Mayo

FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
TOLUCA/MÉXICO/2016





www.inmunologiaavanzadatolucamx.com

### CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

Los Comités Organizador y Científico certifican que la comunicación con el título

224/23 - Effect of stress on expression of tight junction in colon from BALB/c mice

del/de los autor/es

(1) Marycarmen Godínez-victoria, (2) Nancy Machorro-rojas, (3) Teresita Sainz-espuñes, (4) Jorge Ismael Castañeda-sánchez, (5) Judith Del Carmen Pacheco-yepez, (6) Maria Elisa Drago-serrano

ha sido presentada en el

Simposio Internacional de Inmunonutrición Avanzada:
Microbiota e Inmunidad Intestinal,

celebrado en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, los días 23 al 25 de Mayo de 2016.

Toluca, 25 de Mayo de 2016

Dra. Roxana Valdés Ramos

Loxaua (

Organizadora del Simposio

Prof. Ascensión Marcos

Presidenta de ISIN